

26. 3. 2004

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2003年 3月28日
Date of Application:

出願番号 特願2003-092827
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP 2003-092827]

REC'D 03 JUN 2004

WIPO

PCT

出願人
Applicant(s):

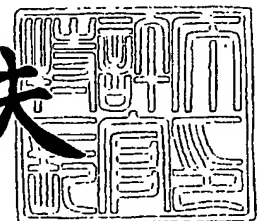
独立行政法人農業生物資源研究所
独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構
日本製紙株式会社
株式会社三和化学研究所

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 5月21日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願
【整理番号】 4903
【提出日】 平成15年 3月28日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12N 15/09
A61K 38/22
A01H 5/10
C12N 5/14

【発明者】

【住所又は居所】 東京都北区王子 5-21-1 日本製紙株式会社技術研究所内

【氏名】 杉田 耕一

【発明者】

【住所又は居所】 東京都北区王子 5-21-1 日本製紙株式会社技術研究所内

【氏名】 遠藤 さおり

【発明者】

【住所又は居所】 東京都北区王子 5-21-1 日本製紙株式会社技術研究所内

【氏名】 海老沼 宏安

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台 2-1-2 独立行政法人農業生物資源研究所内

【氏名】 高岩 文雄

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県名古屋市東区東外堀町 35番地 株式会社三和化学研究所内

【氏名】 城森 幸仁

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県名古屋市東区東外堀町 3 5 番地 株式会社三和化学研究所内

【氏名】 林 祐二

【特許出願人】

【識別番号】 501167644

【氏名又は名称】 独立行政法人 農業生物資源研究所

【特許出願人】

【識別番号】 000195568

【氏名又は名称】 生物系特定産業技術研究推進機構

【特許出願人】

【識別番号】 000183484

【氏名又は名称】 日本製紙株式会社

【代表者】 三好 孝彦

【特許出願人】

【識別番号】 000144577

【氏名又は名称】 株式会社三和化学研究所

【代理人】

【識別番号】 100107984

【弁理士】

【氏名又は名称】 廣田 雅紀

【選任した代理人】

【識別番号】 100102255

【弁理士】

【氏名又は名称】 小澤 誠次

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 044347

【納付金額】 16,800円

【その他】 国以外のすべての者の持分の割合 4 / 5

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 組換えタンパク質が高生産された植物貯蔵器官の生産方法及び新規組換えタンパク質

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 組換えタンパク質が高生産された植物貯蔵器官を生産する方法であって、次の過程 (A)、(B)、(C)、からなることを特徴とする方法。

(A) 植物の貯蔵器官中に発現させる組換えタンパク質遺伝子、サイトカイニン関連遺伝子、薬剤耐性遺伝子及び脱離能を有する DNA 因子を含み、かつ、サイトカイニン関連遺伝子と薬剤耐性遺伝子は脱離能を有する DNA 因子と挙動を一にする位置に存在し、植物の貯蔵器官中に発現させる組換えタンパク質遺伝子は脱離能を有する DNA 因子とは挙動を一にしない位置に存在するベクターを構築し、該ベクターを細胞中に導入する過程。

(B) 上記 (A) により、ベクターが導入された植物細胞を、薬剤添加培地及び薬剤非添加培地にて培養を行うことにより形質転換体を再分化せしめる過程。

(C) 上記 (B) にて再分化した形質転換体から、植物貯蔵器官を得る過程。

【請求項 2】 ベクターが導入された植物細胞から形質転換体を再分化せしめる過程において、ベクターが導入された植物細胞を植物ホルモン及び薬剤添加培地で培養した後、植物ホルモン及び薬剤非添加培地で培養を行うことを特徴とする、請求項 1 記載の組換えタンパク質が高生産された植物貯蔵器官を得る方法。

【請求項 3】 植物貯蔵器官中に発現させる組換えタンパク質遺伝子が、該植物貯蔵器官特異的プロモーターの制御下にあることを特徴とする、請求項 1 又は 2 記載の組換えタンパク質が高生産された植物貯蔵器官を生産する方法。

【請求項 4】 植物貯蔵器官中に発現させる組換えタンパク質遺伝子が、該植物貯蔵器官で本来発現しているタンパク質遺伝子中、タンパク可変領域をコードする位置に挿入又は置換されていることを特徴とする、請求項 3 記載の組換えタンパク質が高生産された植物貯蔵器官を生産する方法。

【請求項 5】 組換えタンパク質遺伝子と植物貯蔵器官で本来発現しているタンパク質遺伝子との境界に、該組換えタンパク質を植物貯蔵器官で本来発現し

ているタンパク質から切断分離するための酵素切断アミノ酸配列をコードする塩基配列を配置することを特徴とする、請求項4記載の組換えタンパク質が高生産された植物貯蔵器官を生産する方法。

【請求項6】 植物貯蔵器官が種子であることを特徴とする、請求項1～5のいずれかに記載の組換えタンパク質が高生産された植物貯蔵器官を生産する方法。

【請求項7】 植物貯蔵器官中に発現させる組換えタンパク質遺伝子を、タンパク可変領域に挿入又は置換する該植物貯蔵器官で本来発現している遺伝子が、種子貯蔵タンパク質遺伝子であることを特徴とする、請求項6に記載の組換えタンパク質が高生産された植物貯蔵器官を生産する方法。

【請求項8】 サイトカイニン関連遺伝子が、サイトカイニン合成系遺伝子であることを特徴とする、請求項1～7のいずれかに記載の組換えタンパク質が高生産された植物貯蔵器官を生産する方法。

【請求項9】 サイトカイニン合成系遺伝子がイソペンテニルトランスフェラーゼ遺伝子であることを特徴とする、請求項8記載の組換えタンパク質が高生産された植物貯蔵器官を生産する方法。

【請求項10】 薬剤耐性遺伝子がハイグロマイシン耐性遺伝子であることを特徴とする、請求項1～9のいずれかに記載の組換えタンパク質が高生産された植物貯蔵器官を生産する方法。

【請求項11】 脱離能を有するDNA因子が、部位特異的組換え系又はトランスポゾンに由来するものであることを特徴とする、請求項1～10のいずれかに記載の組換えタンパク質が高生産された植物貯蔵器官を生産する方法。

【請求項12】 植物の貯蔵器官中に発現させる組換えタンパク質遺伝子が、GLP-1(7-36)遺伝子、あるいは、GLP-1(7-36)のアミノ酸配列の1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加された配列からなり、かつGLP-1活性を有するペプチドをコードする遺伝子であることを特徴とする、請求項1～11のいずれかに記載の組換えタンパク質が高生産された植物貯蔵器官を生産する方法。

【請求項13】 植物の貯蔵器官中に発現させる組換えタンパク質遺伝子が、

GLP-1 (7-36) あるいはそのアミノ酸配列の1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加された配列からなり、かつGLP-1活性を有するペプチドにおいて、26位をグルタミンに、34位をアスパラギン又はアスパラギン酸に置換したGLP-1誘導体をコードする遺伝子であることを特徴とする、請求項1～11のいずれかに記載の組換えタンパク質が高生産された植物貯蔵器官を生産する方法。

【請求項14】 植物の貯蔵器官中に発現させる組換えタンパク質遺伝子が、アミノ酸配列の8位をセリン又はグリシンに置換したGLP-1誘導体をコードする遺伝子であることを特徴とする、請求項12又は13に記載の組換えタンパク質が高生産された植物貯蔵器官を生産する方法。

【請求項15】 植物の貯蔵器官中に発現させる組換えタンパク質遺伝子が、配列表の配列番号1に記載の遺伝子であることを特徴とする、請求項14に記載の組換えタンパク質が高生産された植物貯蔵器官を生産する方法。

【請求項16】 植物が、単子葉植物であることを特徴とする、請求項1～15のいずれかに記載の組換えタンパク質が高生産された植物貯蔵器官を生産する方法。

【請求項17】 単子葉植物がイネであることを特徴とする、請求項16記載の組換えタンパク質が高生産された植物貯蔵器官を生産する方法。

【請求項18】 請求項1～17のいずれかに記載の生産方法により生産された組換えタンパク質が高生産された植物貯蔵器官又はそれを生産する形質転換植物。

【請求項19】 GLP-1 (7-36) あるいはそのアミノ酸配列の1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加された配列からなり、かつGLP-1活性を有するペプチドにおいて、26位をグルタミンに、34位をアスパラギン又はアスパラギン酸に置換したアミノ酸配列を有するGLP-1誘導体。

【請求項20】 GLP-1 (7-36) 或いはそのアミノ酸配列の1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加された配列からなり、かつGLP-1活性を有するペプチドが、GLP-1 (7-36)、GLP-1 (7-3

7) 又はそれらのC末端アミドである、請求項19に記載のGLP-1誘導体。

【請求項21】 アミノ酸配列の8位をセリン又はグリシンに置換したことを特徴とする、請求項19又は20に記載のGLP-1誘導体。

【請求項22】 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するGLP-1誘導体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、遺伝子工学的手法により組換えタンパク質を植物の貯蔵器官中に高生産させる方法、及び、ペプチダーゼ耐性化したヒトグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) の新規誘導体とその利用に関する。なお、本発明で、「組換えタンパク質」とは、「組換えペプチド及び組換えタンパク質」を包含するものである(以下、「組換えタンパク質」と表示する)。

【0002】

【従来の技術】

遺伝子工学技術を利用した医薬品、臨床検査薬や工業原料の生産は、既に実産業において多大の貢献をなしている。特に、微生物と哺乳類培養細胞を宿主とした、物質生産系が広く利用されている。しかしながら、微生物や哺乳類細胞を培養するには、無菌環境が整った培養設備、培地等の設備が必要であり、さらに、その培養には石油エネルギーの消費が伴うためコスト高となっている。また、哺乳類細胞を宿主として用いると、人体に有害なウイルスの混入リスクが避けられない。

そのため、これらの培養による物質生産にかわる、安価で安全な物質生産システムとして形質転換植物を用いた物質生産システムの開発が行われている。例えば、生分解性ポリエステル等の高分子化合物(例えば、特開2002-262886号公報)、ワクチン(例えば、G. Jaeger et al., Eur. J. Biochem. 259, 426, 1999)、ラクトフェリン(D. Chong et al., Transgenic. Res. 9, 71, 2000)等のタンパク質や、エンケファリン(特開2000-106890号公報)等のペプチドを生産する形質転換植物の作製が現在までに報告されている。

【0003】

形質転換植物の場合、その植物の可食部、例えば、ダイズやイネの種子、野菜の葉などで人体に有益な機能性物質を生産させれば、目的物質の抽出工程を経ることなく、直接人体に経口摂取することが可能である。さらに、種子の場合には、冷蔵装置の完備した設備で保存や輸送を行う必要がなく、室温での安定的な長期保存が可能である（例えば、E. Stoger et al., Plant. Mol. Biol. 42, 583, 2000）。また、種子から目的の物質を抽出する場合にも、葉と異なりフェノール性物質の混入がほとんどなく、容易に精製することができる。従って、種子は目的の遺伝子産物を生産させる器官として理想的だと考えられ、これまでに、例えば、グリシニン(T. Katsube et al., Plant. Physiol. 120, 1063, 1999)等のタンパク質、 $(1, 3-1, 4)-\beta$ -グルカナーゼ(H. Horvath et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 97, 1914, 2000)等の酵素、エンケファリン(D. Chong et al., Transgenic. Res., 9, 71, 2000)等のペプチドを生産した種子の作製が報告されている。

【0004】

しかしながら、形質転換植物による物質生産システムは、前記の優れた特性を持っていながら、現在の主流である微生物や哺乳類細胞培養システムに比較し生産効率は悪く、特に、種子による生産効率は悪かった。この問題を解決するため、形質転換植物における物質生産能力の増強策が様々に考案されている。例えば、種子での物質生産能力を改善するため、種子で強力に発現する種子貯蔵タンパク質のプロモーターの利用(例えば、T. Katsube et al., Plant. Physiol., 120, 1063, 1999)、このプロモーターとこれに作用して発現を向上させる転写因子との併用(例えば、D. Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 98, 11438, 2001)、5' 非翻訳領域の挿入(例えば、特開 2002-58492 号公報)、遺伝子中の C+G 含量の最適化(H. Horvath et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 97, 1914, 2000)、小胞体への移行シグナルの付加(例えば、特開 2000-504567 号公報)等、発現と蓄積向上に関する研究が精力的に行われている。また、別の方法では、外来遺伝子を導入する植物体として、種子貯蔵タンパクを欠く突然変異体を用いることにより外来遺伝子産物の種子での生産量が向

上したことが報告されている（特開 2002-58492 号公報）。しかしながら、これらの改良だけでは生産量は十分とは言えず、新たな手法の開発が望まれていた。

【0005】

一方、GLP-1 (Glucagon like peptide-1) は、食物摂取により消化管より分泌され、膵臓に働いて糖依存的なインスリン分泌を刺激するホルモンとして知られている。2 型糖尿病患者では、この GLP-1 に対する応答性は維持されているが、量的な不足がいられている。GLP-1 剤の開発は、GLP-1 の不足分を補い、インスリン分泌促進剤としての糖尿病治療薬への応用に期待が持たれている。しかしながら、GLP-1 の活性本体は、GLP-1 (7-36) アミドあるいは GLP-1 (7-37) のポリペプチドであり、GLP-1 の経口摂取では消化管内で消化酵素により消化・分解され、十分に吸収されない。このため臨床では、点滴による静脈内注射や皮下注射が試みられているのが現状である。しかも、GLP-1 は、血中や組織に存在するジペプチジルペプチダーゼ IV (DPP-IV) によって分解を受け、活性半減期が 1~2 分と非常に短いことや、腎臓から排泄され易く血中半減期が 5 分以内であることが報告されており、これらが臨床応用へのネックになっている。

【0006】

そこで、分解されにくく半減期の長い GLP-1 誘導体の開発が行われている。例えば、8 位アミノ酸置換誘導体 (Diabetologia 41, 271-278, 1998、Biochem 40, 2860-2869, 2001)、N 末端および C 末端アミノ酸の修飾体 (WO 9808871 など)、34 位を Arg に置換し 26 位 Lys に親油性基を導入した誘導体 (WO 0007617)、及び配列全般に渡るアミノ酸置換による誘導体 (WO 9943705、WO 9111457) である。また、皮下からの吸収が遅い徐放型注射剤の開発、あるいは GLP-1 様アゴニスト活性をもち、血中半減期の長いトカゲ由来の合成 Exendin-4 での注射剤の開発 (Am J Physiol 281, E155-E161, 2001) が行われている。しかし、これらは注射剤であり、患者の負担を考慮すると注射以外の経路で投与される新規 GLP-1 誘導体が望まれる。

【0007】

【特許文献1】

特開 2000-504567 号公報。

【特許文献2】

特開 2002-58492 号公報。

【特許文献3】

特開 2002-106890 号公報。

【特許文献4】

特開 2002-262886 号公報。

【特許文献5】

WO 9111457。

【特許文献6】

WO 9808871。

【特許文献7】

WO 9943705。

【非特許文献1】

Eur. J. Biochem., 259, 426, 1999。

【非特許文献2】

Transgenic. Res., 9, 71, 2000。

【非特許文献3】

Plant. Mol. Biol., 42, 583, 2000。

【非特許文献4】

Plant. Physiol., 120, 1063, 1999。

【非特許文献5】

Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 97, 1914, 2000。

【非特許文献6】

Transgenic. Res., 9, 71, 2000。

【非特許文献7】

Plant. Physiol., 120, 1063, 1999。

【非特許文献 7】

Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 98, 11438, 2001。

【非特許文献 8】

Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 97, 1914, 2000。

【非特許文献 9】

Diabetologia 41, 271-278, 1998。

【非特許文献 10】

Biochem 40, 2860-2869, 2001。

【非特許文献 11】

Am J Physiol 281, E155-E161, 2001。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、遺伝子工学的手法により組換えタンパク質を植物貯蔵器官中で高生産させる方法、該方法により高生産された組換えタンパク質が生産された植物貯蔵器官、及び、ペプチダーゼ耐性化したヒトグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) の新規誘導体とその利用を提供することにある。

【0009】

すなわち、形質転換植物の貯蔵器官による物質生産を増強させるため、前記のような様々な試みがなされている。しかしながら、医薬品等として有用な組換えタンパク質が生産された植物貯蔵器官を食事として摂取し、その十分な機能を体内で発揮させるには、より高度に組換えタンパク質を植物貯蔵器官で高生産させる方法の開発が必要である。同時に、植物から組換えタンパク質を抽出し、医薬品や機能性食品として加工する場合にも、それらの貯蔵器官に組換えタンパク質が高生産されていることがコスト面で重要である。従って、本発明の目的の一つは、組換えタンパク質を形質転換植物の貯蔵器官中で高生産させる新規な方法を提供することにある。

【0010】

また、前記方法の植物貯蔵器官中で高生産させる組換えタンパク質として GLP-1 を選択すれば、通常の食事のように果実や米等を摂取するだけで糖尿病治

療効果が期待できる。しかし、前記したように、この天然型 GLP-1 は、消化管内で消化酵素により消化・分解されるので、経口的に安定して投与することができず、したがって、現状では注射以外の有効な投与方法がない。そこで、何らかの方法により消化を受けずに胃を通過できれば、小腸で吸収されるのではないかと考えられる。ただし、吸収時には、GLP-1 は単体として存在しなければならない。その際に、天然型 GLP-1 では、トリプシンなどの酵素により分解を受け失活してしまう。

【0011】

更に、天然型 GLP-1 は、吸収された後もジペプチジルペプチダーゼ IV による分解を受け、作用の持続は期待できない。したがって、天然型 GLP-1 の経口投与によって薬理効果を得るには、アミノ酸置換によってトリプシンやジペプチジルペプチダーゼ IV による分解を受けにくく、活性に持続性のある GLP-1 誘導体をデザインする必要がある。

従って、本発明の他の目的の一つは、組換えタンパク質を形質転換植物の貯蔵器官で高生産させる新規な方法を提供することと、更に他の目的の一つは、トリプシン等の消化酵素に対する耐性をもつ経口投与が可能な新規 GLP-1 誘導体、更に好ましくは、ジペプチジルペプチダーゼ IV に対する耐性をも合わせもつ新規 GLP-1 誘導体を提供することにある。このためには、食事として摂取された場合に吸収され、薬理効果を示す GLP-1 誘導体を得ることである。

【0012】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、組換えタンパク質を形質転換植物の貯蔵器官で高生産させる方法について、鋭意研究した結果、植物の貯蔵器官中に発現させる組換えタンパク質の遺伝子、サイトカイニン関連遺伝子、薬剤耐性遺伝子及び脱離能を有する DNA 因子を含み、かつ、サイトカイニン関連遺伝子と薬剤耐性遺伝子は脱離能を有する DNA 因子と挙動を一にする位置に存在し、植物の貯蔵器官中に発現させる組換えタンパク質の遺伝子は脱離能を有する DNA 因子とは挙動を一にしない位置に存在するベクターを構築し、該ベクターを細胞中に導入し、該遺伝子が導入された植物の細胞から形質転換体を再分化せしめ、該再分化した形質転換体から

貯蔵器官を得ることにより、組換えタンパク質を形質転換植物の貯蔵器官で高生産させることができることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0013】

また、本発明は、該組換えタンパク質を植物貯蔵器官で高生産させる方法を、糖依存的なインスリン分泌を刺激するホルモンとして知られているGLP-1に適用すると共に、該GLP-1の誘導体を作製して、消化酵素等により消化・分解されない、更には、血漿中でも安定なGLP-1の誘導体を提供するものである。すなわち、本発明者らは、GLP-1(7-36)あるいはそのアミノ酸配列の1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加された配列からなり、かつGLP-1活性を有するペプチドにおいて、26位をグルタミンに、34位をアスパラギン又はアスパラギン酸に置換したGLP-1誘導体が、天然型GLP-1と同程度の活性を維持し、トリプシンのような消化酵素に対する耐性を持ち、経口投与が可能であることを見出した。また、更に8位のアラニンをセリン又はグリシンに変更することにより、ジペプチジルペプチダーゼIVに対する耐性をも獲得し、血漿中でも安定であることを見出し本発明をなした。

【0014】

【発明の実施の形態】

〔組換えタンパク質高生産植物貯蔵器官の生産〕

本発明は、組換えタンパク質が高生産された植物貯蔵器官を得る方法であって、次の過程(A)、(B)、(C)からなるものである：(A)植物の貯蔵器官中に発現させる組換えタンパク質遺伝子、サイトカイニン関連遺伝子、薬剤耐性遺伝子及び脱離能を有するDNA因子を含み、かつ、サイトカイニン関連遺伝子と薬剤耐性遺伝子は脱離能を有するDNA因子と挙動を一にする位置に存在し、植物の貯蔵器官中に発現させる組換えタンパク質遺伝子は脱離能を有するDNA因子とは挙動を一にしない位置に存在するベクターを構築し、該ベクターを細胞中に導入する過程、(B)上記(A)により、ベクターが導入された植物細胞を、薬剤添加培地及び薬剤非添加培地にて培養を行うことにより形質転換体を再分化せしめる過程、(C)上記(B)にて再分化した形質転換体から、植物貯蔵器官を得る過程。以下、本発明について詳細に説明する。

【0015】

(対象植物)

本発明で植物貯蔵器官の生産に用いる対象植物としては、貯蔵器官が形成されるものであれば、特に限定されるものではないが、双子葉植物としては、タバコ、ナタネ、ダイズ等を、単子葉植物としては、イネ、トウモロコシ、オオムギ、コムギ等の穀類やアスパラガス等を、代表的なものとして挙げるができる。また、本発明で組換えタンパク質を高生産させる植物貯蔵器官としては、特に限定されるものではないが、果実、塊根、塊茎、種子等を、代表的なものとして挙げるができる。

【0016】

(使用する遺伝子)

本発明において使用する遺伝子は、cDNA又はゲノムDNAのクローニングにより得ることができる。また、あらかじめそのDNA配列が明らかにされているものであれば、これを化学合成して得てもよい。さらに、DNA配列が明らかでなくとも、アミノ酸配列が明らかであれば、アミノ酸配列から推定されるDNA配列を化学合成できる。

本発明において、遺伝子とは、その発現のために必要なプロモーター配列、ターミネーター配列を含む。これらは、植物において機能するものでありさえすれば、別に制限なく使用することができる。例えば、このようなプロモーターとしては、カリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーター(J. T. Odell et al., Nature (London), 313, 810, 1985)、ノパリン合成酵素のプロモーター(W. H. R. Langridge et al., Plant Cell Rep., 4, 355, 1985)等を使用することができる。更に、誘導型プロモーターを用いれば、遺伝子発現を制御することができる。

【0017】

かかる誘導型プロモーターは現在までに数多く知られている。例えば、化学物質に反応して誘導されるものとして、グルタチオン-S-トランスフェラーゼI系遺伝子のプロモーター(特開平5-268965号公報)、グルタチオン-S-トランスフェラーゼII系遺伝子のプロモーター(国際公開WO93/0129

4号公報)、T e tリプレッサー融合型カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター(C. Gatz et al., Mol. Gen. Genet., 227, 229, 1991)、L a cオペレーター/リプレッサー系プロモーター(R. J. Wilde et al., The EMBO Journal, 11, 1251, 1992)、a l c R/a l c A系プロモーター(国際公開WO94/03619号公報)、グルココルチコイド系プロモーター(青山卓史、蛋白質核酸酵素、41:2559、1996)、p a r系プロモーター(T. Sakai et al., Plant Cell Physiol., 37, 906, 1996)等が、また光に反応して誘導されるものとしてリブ羅斯2リン酸カルボキシラーゼ小サブユニット遺伝子(r b c S)のプロモーター(R. Fluhr et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 2358, 1986)、フルクトース-1, 6-ビスホスファターゼ遺伝子のプロモーター(特表平7-501921号公報)、集光性クロロフィルa/b結合タンパク質遺伝子のプロモーター(特開平5-89号公報)等が、その他、傷害、温度などのさまざまな外部環境等に反応して誘導されるプロモーターが知られている。

【0018】

本発明の組換えタンパク遺伝子のプロモーターとしては、上記したような、35Sプロモーター等の恒常的発現を示すプロモーターや、誘導型プロモーターを用いることもできるが、組換えタンパク質遺伝子を生産させようとする植物貯蔵器官中での発現が保証されている、該植物貯蔵器官特異的プロモーターが特に望ましい。このように植物の特定組織や器官において特異的な発現を促進するプロモーターに関しても、当業者らに広く知られている。例えば、本発明においては、かかるプロモーターとして、イネ種子で外来遺伝子を発現させる種子貯蔵タンパク遺伝子のプロモーターである、グロブリン遺伝子のプロモーター(M. Nakase et al., Plant Mol. Biol., 33, 513, 1997)、グルテリン遺伝子のプロモーター(F. Takaiwa et al., Plant Mol. Biol., 17, 875, 1991)等を用いることができる。さらに、インゲンマメ、ソラマメ、エンドウ等の豆科作物や、ピーナツ、ゴマ、ナタネ、綿実、ヒマワリ、サフラワー等の油糧用種子作物の種子で外来遺伝子を発現させるプロモーターである、グリシニン遺伝子のプロモーター、グルシフェリン遺伝子のプロモーター(J. Rodin et al., Plant Mol. Biol., 20, 559, 1992)等、各作物の主要種子貯蔵タンパク遺伝子のプロモーターも用いること

ができる。

【0019】

一方、本発明において、ターミネーターとしては、ノパリン合成酵素のターミネーター(A. Depicker et al., J. Mol. Appl. Gen., 1, 561, 1982)、オクトピン合成酵素のターミネーター(J. Gielen et al., EMBO J., 3, 835, 1984)を始め、DNAデータベースに登録されている植物遺伝子のターミネーター等を種々選択して使用することができる。

本発明において、植物に導入できる組換えタンパク遺伝子は、人や家畜等の動物の健康に寄与できる機能性ペプチド、医薬用ペプチド等をコードする遺伝子だけでなく、機能未知な任意のペプチドをコードする遺伝子であってもよい。例えば、本発明の実施例においては、GLP-1誘導体をコードする遺伝子を植物に導入し、植物の種子においてGLP-1誘導体を生産させたが、本発明の手法により植物の貯蔵器官で生産させることができる組換えタンパク質としては、GLP-1やその誘導体に限られるものではなく、既に医薬品として使用又は開発されている様々なペプチドやタンパク(S. Josephson and R. Bishop, TIBTECH, 6, 218, 1988)を始め、近年見出されたコレステロール低減化ペプチド(例えば、特開2001-114800号公報)、ダニや花粉抗原のT細胞エпитープペプチド(例えば、米国特許6268491号、特開平10-7700号公報、特開平10-259198号公報、特開平10-506877号公報、特開平11-92497号公報、特開2000-327699号公報)等、様々なタンパク質を本発明の手法により植物貯蔵器官で生産させることができる。

【0020】

更に、これらのペプチドは、その性質及び目的に応じて適宜改変したものを生産させてもよい。即ち、GLP-1について例示すると、本願発明はGLP-1の他、GLP-1(7-36)あるいはそのアミノ酸配列の1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加された配列からなり、かつGLP-1活性を有するペプチド、又は、該ペプチドの26位をグルタミンに、34位をアスパラギン又はアスパラギン酸に置換したアミノ酸配列を有するGLP-1誘導体に適用できる。また、本願発明は、GLP-1(7-36)或いはそのアミノ酸配列の

1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加された配列からなり、かつGLP-1活性を有するペプチドが、GLP-1(7-36)、GLP-1(7-37)又はそれらのC末端アミドであるGLP-1誘導体にも適用できる。更に、本願発明は、これらのGLP-1誘導体の8位をセリン又はグリシンに置換したGLP-1誘導体及び配列番号2に記載のGLP-1誘導体にも適用できる。

【0021】

(導入組換えタンパク質遺伝子の構築)

本発明においては、これら組換えタンパク質をコードする遺伝子(DNA配列)を、例えば、種子貯蔵タンパクの遺伝子中、その種子貯蔵タンパクの特性に変化を生じさせない可変領域をコードする遺伝子配列に挿入、又は置換した融合遺伝子を用いることができる。例えば、実施例においては、このGLP-1誘導体をコードする遺伝子をグロブリン遺伝子中、タンパク可変領域をコードする位置に挿入し、融合遺伝子として使用した。このとき、ペプチド遺伝子又はタンパク遺伝子と種子貯蔵タンパク遺伝子の境界に酵素切断配列を配置することにより、種子貯蔵タンパクと同様に抽出した後、酵素処理により、目的の組換えタンパク質を切り出させ精製することができる。さらに、トリプシンなどの消化酵素による切断配列をここに配置すれば、本発明の手法により組換えタンパク質が高生産された種子を食事として摂取した後、目的のタンパク質は小腸で切断され体内へ吸収されることとなり、様々な生理機能を発揮できる。

【0022】

なお、種子貯蔵タンパクとは、主として種子に貯蔵されるタンパクであり、発芽に必要な栄養素として重要な働きをする(稻学大成第3巻、農山漁村文化協会)。本発明で用いることができる種子貯蔵タンパク遺伝子の種類は特に限定されるものではなく、例えば、イネのグロブリンや、グルテリン、プロラミン、シロイヌナズナの2Sアルブミン(特開2000-106890号公報)等の遺伝子を用いることができる。更に、ペプチド遺伝子やタンパク遺伝子の挿入位置は、種子貯蔵タンパク遺伝子が本来コードしているタンパクの特性に変化を生じさせない可変領域であれば、特に限定されるものではない。例えば、本発明の実施例

では、イネのグロブリンの109番目のアミノ酸部位をコードする位置へGLP-1誘導体をコードする遺伝子を挿入した。

【0023】

(導入ベクターの構築)

本発明においては、サイトカイニン関連遺伝子と薬剤耐性遺伝子が、脱離能を有するDNA因子と挙動を一つにする位置に存在し、また、これとは挙動を一つにすることのない位置に前記組換えタンパク質遺伝子が存在するように構築したベクターにより、植物に遺伝子の導入を行う。

ここでサイトカイニン関連遺伝子とは、植物における細胞分裂の促進や植物の組織からの定芽や不定芽の分化等を引き起こす機能を有するサイトカイニンの生成等に関与する遺伝子のことをいう。

【0024】

かかるサイトカイニン関連遺伝子としては、例えば、アグロバクテリウム・ツメファシエンス（以下、A. ツメファシエンスと略する。）由来の*i p t*遺伝子（A. C. Smigocki、L. D. Owens, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5131, 1988）、ロドコッカス由来の*i p t*遺伝子、シロイヌナズナ由来のサイトカイニン合成酵素遺伝子、シュードモナス由来の*p t z*遺伝子等のサイトカイニン合成遺伝子の他、不活性型サイトカイニンを活性化する遺伝子である大腸菌由来の β -glucuronidase遺伝子（Morten Joersbo and Finn T. Okkels, Plant Cell Reports 16, 219-221, 1996）や、サイトカイニン受容体遺伝子と考えられているシロイヌナズナ由来のCKI1遺伝子（Kakimoto T. Science 274, 982-985, 1996）等のサイトカイニン関連遺伝子が、いずれも本発明において使用することができる。

【0025】

また、本発明において、薬剤耐性遺伝子とは、これが導入された植物細胞に、抗生物質耐性や農薬耐性を付与する遺伝子のことをいう。かかる抗生物質耐性遺伝子としては、例えば、ハイグロマイシン耐性遺伝子（HPT：ハイグロマイシンリン酸化酵素遺伝子）やカナマイシン耐性遺伝子（NPTII：ネオマイシンリン酸化酵素遺伝子）等を、農薬耐性遺伝子としては、スルフォニルウレア系耐性遺伝子（ALS；アセトラクテート合成酵素遺伝子）等を使用することができる。

る。

【0026】

本発明において、脱離能を有するDNA因子とは、これらが存在し、機能する染色体DNA等から、それ自身が脱離し得る能力を有するDNA配列をいう。植物ではこのような因子として、染色体上に存在するトランスポゾンと呼ばれるものが知られており、その構造と働き、そしてその挙動もほぼ判明している。すなわち、トランスポゾンが機能するためには、原則として、その内部にある遺伝子から発現し、それ自身の脱離及び転移を触媒する酵素（転移酵素）と、やはりその内部の末端領域に存在し、この転移酵素が結合し作用するDNA配列という、2つの構成要素が必要とされる。これらの働きにより、トランスポゾンはその存在する染色体上から脱離し、その後、普通はDNA上の新たな位置に転移するが、一定の確率で転移できぬままその機能を失い、消失等をする場合も生ずるので、本発明ではこのようなトランスポゾンの転移ミスを利用する。

【0027】

なおトランスポゾンには、このような自律性トランスポゾン、すなわち、転移酵素とDNA結合配列という2つの要素を保持していて、トランスポゾン内部から発現する転移酵素が末端領域に存在するDNA配列に結合して作用することにより、自律的にその存在する染色体上から脱離して転移しうるものの他、非自律性トランスポゾンと呼ばれるタイプもある。この非自律性トランスポゾンとは、転移酵素が結合し作用する末端のDNA配列は保持しているものの、内部にある転移酵素遺伝子に変異が生じており、転移酵素の発現がないため、自律的に染色体上から脱離することができないものをいう。しかし、非自律性トランスポゾンも、自律性トランスポゾンあるいはこれとは独立して存在する転移酵素遺伝子から転移酵素が供給されると、自律性トランスポゾンと同様の挙動を示すこととなる。

【0028】

自律性トランスポゾンとしては、トウモロコシより単離されたAcとSp_m等がある（A. Gieri and H. Saedler, Plant Mol. Biol., 19, 39, 1992）。とりわけAcは、トウモロコシの染色体中、wx-m7遺伝子座を制限酵素Sau3

Aで切り出すことにより得ることができる (U. Behrens et al., Mol. Gen. Genet. 194, 346, 1984)、植物トランスポゾンの中では最も解析の進んでいる自律性トランスポゾンであり、そのDNAシーケンスも既に解明されているので (M. Muller-Neumann et al., Mol. Gen. Genet., 198, 19, 1984)、当業者が容易に取得可能なことから、本発明に使用するDNA因子として相応しい。また、非自律性トランスポゾンとしては、それぞれAc、Spmの内部領域が欠損したものである、DsやdSpmを始め (H. -P. Doring and P. Starlinger, Ann. Rev. Genet. 20, 175, 1986)、トウモロコシ以外にも、キンギョソウ、アサガオ等の多くの植物から単離されたもの (例えば、Y. Inagaki et al., Plant Cell, 6, 375, 1994) が知られている。

【0029】

因みに、これらのトランスポゾンは、その由来する植物と異なる種類の植物の染色体に導入された場合でも、その能力を発揮して脱離し、転移することが多くの例で知られている (例えば、B. Baker et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 4844, 1986)。なお、本発明においては、自律性、非自律性のいずれのトランスポゾンを使用することもできる。非自律性のトランスポゾンを用いる場合には、これに加え、自律性トランスポゾン等から取得、または合成した転移酵素遺伝子を導入する必要があるが、その場合は、本発明のベクターにこの非自立性トランスポゾンを組込んで導入してもよく、また、全く別個に導入してもよい。

【0030】

更に、植物以外に存在する脱離能を有するDNA因子としては、部位特異的組換え系 (site-specific recombination system) に由来するものが知られている。この部位特異的組換え系は、特徴的なDNA配列を有する組換え部位 (本発明の脱離能を有するDNA因子にあたる。)、及びこのDNA配列に特異的に結合して、その配列が2以上存在したとき、その配列間の組換えを触媒する酵素、という2つの要素からなり、そして、このDNA配列が同一DNA分子上に、同一方向を向いてある一定の間隔で2か所存在している場合には、これに挟まれた領域がこのDNA分子 (プラスミド、染色体等) から脱離し、またこの配列が対向する方向を向いて2か所存在している場合には、この領域が反転する、という挙

動を示す。本発明では、この前者の脱離作用を利用する。なお組換え酵素をコードする遺伝子は、必ず組換え部位と同一のDNA分子上に存在する必要はなく、これと同一細胞内に存在し、発現していさえすれば、このDNA配列間の脱離・反転を生ぜしめ得ることが知られている (N. L. Craig, Annu. Rev. Genet., 22, 77, 1988)。

【0031】

現在、部位特異的組換え系は、ファージ、細菌 (例えば大腸菌)、酵母等の微生物から分離された Cre/lox 系、R/R S 系、FLP 系、cer 系、fim 系等が知られているが (総説として、N. L. Craig, Annu. Rev. Genet., 22, 17, 1988)、高等生物ではまだその存在を知られていない。しかし、これらの微生物から分離された部位特異的組換え系も、国際公開 WO 93/01283 号公報において、P1 ファージ由来の Cre/lox 系が植物への遺伝子導入用ベクターに利用されているように、その由来する生物種と異なる生物種 (植物を含む) に導入された場合でも、そのそもそもの生物内における挙動と同一の挙動をとることが明らかとなっている。ちなみに本発明の一実施例では、酵母 (*Zygosaccharomyces rouxii*) の部位特異的組換え系である R/R S 系 (H. Matsuzaki et al., J. Bacteriology, 172, 610, 1990) を、その組換え部位間に組換え酵素を挿入して利用したが、この R/R S 系もまた、高等植物においてその本来の機能を維持することがすでに報告されている (H. Onouchi et al., Nucleic Acid Res., 19, 6373, 1991)。

【0032】

本発明において、サイトカニン関連遺伝子と薬剤耐性遺伝子を挿入する場所は、脱離能を有する DNA 因子と共に、これが脱離し得る位置でありさえすればよい。例えば、脱離能を有する DNA 因子として自律性トランスポゾンを用いた場合には、転移酵素遺伝子のプロモーター領域より上流で、この転移酵素が結合する末端領域よりは下流の、トランスポゾンの脱離に影響を及ぼさない位置にこれを挿入することができる。また R/R S 系を用いた場合には、組換え部位に挟まれた領域内で、組換え酵素の発現を阻害しない位置でありさえすれば、これをどこにでも挿入することができる。

【0033】

(構築したベクターの植物細胞への導入)

本発明においては、上記のようにして構築したベクターを植物細胞に導入する。該ベクターを導入する植物としては、貯蔵器官を形成する植物であれば特に限定はされないが、例えば、単子葉植物であれば、イネ、トウモロコシ、オオムギ、コムギ等の穀類やアスパラガス等を、双子葉植物であれば、タバコ、ナタネ、ダイズ等を代表的な植物として挙げることができる。構築したベクターの植物細胞への導入は、公知の方法を使用して導入することができる。例えば、アグロバクテリウム属細菌を介する方法の他、エレクトロポレーション法、ポリエチレングリコール法、パーティクルガン法等、公知の方法をいずれも使用することができ、特に限定されることはない。

【0034】

例えば、本発明の方法を用いてイネに組換えタンパク質遺伝子を導入する場合には、特許第3141084号記載の方法を好適に使用することができる。このときイネ種子を播種し、発芽させるための播種培地としては、例えば、N6C12培地(N6無機塩類及びビタミン類、30g/L シュークロース、2.8g/L プロリン、0.3g/L カザミノ酸、2mg/L 2,4-D、4g/L ゲルライト)等を使用することができる。しかしながら、上記培地組成に特に限定されることはなく、その組成物の種類や濃度を変更することによっても、本発明を実施することができる。

【0035】

(薬剤添加培地での培養)

遺伝子導入処理後の植物細胞は、ベクターに組込んだ薬剤耐性遺伝子に対応する薬剤を添加した培地(薬剤添加培地)で公知の方法により培養することができる。例えば、上記ベクターにハイグロマイシン耐性遺伝子やカナマイシン耐性遺伝子のような抗生物質耐性遺伝子を組込んだ場合は、ハイグロマイシンやカナマイシンのような抗生物質を添加した培地で、或いは、スルフォニルウレア系耐性遺伝子のような農薬耐性遺伝子を組込んだ場合は、スルフォニルウレア系農薬を添加した培地で、遺伝子導入処理後の植物細胞を培養する。

【0036】

(遺伝子導入細胞組織からの形質転換体の再分化)

遺伝子導入処理がされた細胞組織から、公知の方法を用いて形質転換体を再分化させる。この場合において、形質転換体とは、定芽、不定芽、不定根等の植物組織又は幼植物体として得られる。例えば、イネであれば、遺伝子導入処理後の発芽種子より胚盤組織を切り出して、この胚盤組織から芽（定芽や不定芽）又は幼植物体を分化させればよい。遺伝子導入処理後のイネの胚盤組織は、例えば、薬剤添加培地N6C12TCH25培地（N6無機塩類及びビタミン類、30g/L シュークロース、2.8g/L プロリン、0.3g/L カザミノ酸、2mg/L 2,4-D、500mg/L カルベニシリン、25mg/L ハイグロマイシン、4g/L ゲルライト）で1週間培養した後、更に、薬剤添加培地N6C14TCH25培地（N6無機塩類及びビタミン類、30g/L シュークロース、2.8g/L プロリン、0.3g/L カザミノ酸、4mg/L 2,4-D、500mg/L カルベニシリン、25mg/L ハイグロマイシン、4g/L ゲルライト）で1週間培養し、次に薬剤非添加培地MSRC培地（MS無機塩類及びビタミン類（Murashige, T. and Skoog, F., 1962, Physiol. Plant., 15, 473）、30g/L シュークロース、30g/L sorbitol、2g/L casamino acids、500mg/L カルベニシリン、4g/L ゲルライト）で培養することにより芽又は幼植物体を再分化させることができる。もちろん、上記に例示した培養条件は絶対的なものではなく、必要に応じ、培地組成の種類や濃度を変更したり、種々の植物ホルモンや薬剤を添加したり、培養期間を変更することができる。

【0037】

(植物貯蔵器官の取得)

本願発明においては、遺伝子導入細胞組織より形質転換体を再分化した後、この形質転換体を公知の方法により生育させて、植物貯蔵器官を取得する。例えば、この形質転換体不定芽である場合には、公知の方法により、発根処理等を行なって、植物個体を再生し、該植物個体を育成して、結実させ、組み換えタンパク質が高生産された植物成熟種子等の貯蔵器官を収穫すればよい。なお、不定芽

の発根は、MS寒天培地に不定芽を挿しつける等の方法を用いて行うことができる。また、形質転換体が幼植物体として得られた場合には、発根処理等を行わずとも形質転換植物を得ることができる。

【0038】

[GLP-1類の生産]

本発明では、本発明の組換えタンパク質が高生産された植物貯蔵器官を生産する方法を用いて、GLP-1類を提供する。GLP-1は、糖依存的なインスリン分泌を刺激するホルモンとして知られているもので、GLP-1 (7-36) とは、His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Argで示される配列（配列表の配列番号2）を持つペプチドである。本発明においては、該GLP-1 (7-36) のアミノ酸配列をコードする遺伝子、或いは、GLP-1 (7-36) のアミノ酸配列の1又は数個のアミノ酸が欠失、置換及び／もしくは付加された配列からなり、かつGLP-1活性を有するペプチドをコードする遺伝子を、上記組換えタンパク質として本発明において構築したベクターに組み込み、該遺伝子を発現させて、GLP-1類を生産する。

【0039】

[GLP-1誘導体]

本発明は、上記のようにGLP-1類の生産方法を提供すると共に、該GLP-1の誘導体を作製して、消化酵素等により消化・分解されない、更には、血漿中でも安定なGLP-1の誘導体を提供するものである。本発明の誘導体は、GLP-1 (7-36) 或いはそのアミノ酸配列の1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加された配列からなり、かつGLP-1活性を有するペプチドにおいて、26位をグルタミンに、34位をアスパラギン又はアスパラギン酸に置換して、該GLP-1誘導体が、天然型GLP-1と同程度の活性を維持し、かつトリプシンのような消化酵素に対する耐性を持たせることによって、経口投与が可能となるように改変したものである。また、更に8位のアラニンをセ

リン又はグリシンに変更することにより、ジペプチジルペプチダーゼIVに対する耐性をも獲得し、血漿中でも安定であるように改変したものである。

【0040】

すなわち、本発明のGLP-1誘導体は、GLP-1 (7-36)、或いは、そのアミノ酸配列の1又は数個のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加された配列からなり、かつ、GLP-1活性を有するペプチドの、26位をグルタミンに、34位をアスパラギンもしくはアスパラギン酸に置換したものであるが、ここで、GLP-1 (7-36) 或いはそのアミノ酸配列の1又は数個のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加された配列からなり、かつGLP-1活性を有するペプチドとは、GLP-1の前駆体、類縁体、およびこれらのC末端アミド体をも含むものであり、好ましくは、GLP-1 (7-36)、GLP-1 (7-37) 又はそれらのC末端アミドである。本発明のGLP-1誘導体は、更に、8位をセリン又はグリシンに置換するのが、特に好ましい。ジペプチジルペプチダーゼIVは、ポリペプチド鎖のN末端から2番目のプロリンあるいはアラニンを認識して、そのカルボキシル基側を加水分解する酵素である。そこで、本発明のGLP-1誘導体は、8位のアラニンをセリンあるいはグリシンに変更することが好ましい。この8位置換体は、天然型GLP-1と同程度の活性を維持し、血漿中でも安定である。

【0041】

上記のとおり、本発明で用いるGLP-1 (7-36) は、次のアミノ酸配列：
His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Argで示される配列を持つペプチドであるが、8位をセリンに改変した[Ser⁸]とは、2番目(8位に相当)のAlaがSerに変換されていることを示す。本発明のGLP-1誘導体は、化学合成あるいは遺伝子組換え技術により、製造することができる。

即ち、ポリペプチドの化学合成の原理は本分野にて周知であり、以下のような本領域の一般のテキストを参考にできる；Dugas H. 及びPenney C, Bioorganic C

hemistry, 1981, Springer-Verlag, New York, pp.54-92、Merrifields JM, Chem. Soc, 85, 2149, 1962、Stewart及びYoung, Solid Phase Peptide Synthesis, pp.24-66, Freeman (San Francisco, 1969)。例えば、430Aペプチド合成機 (PE-Applied Biosystems Inc, 850 Lincoln Center Drive, Foster City CA 94404) 及びPE-Applied Biosystemsにより供給された合成サイクルを用いて、固相方法により本発明のペプチドを合成できる。Bocアミノ酸及びその他の試薬は、PE-Applied Biosystems及び他の薬品供給業者から購入可能である。

【0042】

本発明のGLP-1誘導体の遺伝子組換え技術による生産は、GLP-1誘導体のDNAを全合成、又はより大きな天然のグルカゴンがコードしているDNAの修飾により得た遺伝子を用いて行うこともできる。合成遺伝子の構築方法は本分野では周知であり、BrownらのMethods in Enzymology, Academic Press, NY, 第68巻, 109-151頁を参照できる。

【0043】

また、本発明のGLP-1誘導体の産生に用いるDNAには、上記の他にも、発現量を高め産物を宿主内に安定的に蓄積させる工夫、生産後の精製を容易にする工夫、あるいは融合タンパクとして生産させ容易にGLP-1誘導体を切り出す工夫等を施すことができる。例えば、本発明のGLP-1誘導体遺伝子をタンデムに繋ぎ、発現量を高めるといった手法、または、 β -ガラクトシダーゼ、 β -ラクタマーゼ、プロテインA、TrpEなどのタンパクの遺伝子に繋ぎ、融合タンパクとして産生させるといった手法がそれである。これらの場合、例えば、産生後にGLP-1誘導体を単体として得るには、各遺伝子との間にアミノ酸のメチオニンに対応する遺伝子を入れておき、臭化シアン処理することができる。この場合に、C末端はHse (ホモセリン) になる。また、本発明のGLP-1誘導体の中には、C末端のみにアルギニンをもつものがあり、アルギニルエンドペプチダーゼによる酵素処理により、GLP-1誘導体の単体を得ることができる。

【0044】

なお、前記GLP-1誘導体をコードする遺伝子は、公知の遺伝子工学技術に

より、植物以外の細胞に導入して発現させることで、GLP-1誘導体を生産することもできる。この場合には、GLP-1誘導体をコードする遺伝子を、適切な制限エンドヌクレアーゼを用いて、適切な組換えDNA発現ベクターに挿入する。GLP-1誘導体のための発現ベクターを構築した後、そのベクターを用いて適切な宿主細胞を形質転換させる。宿主細胞には真核性細胞又は原核性細胞のいずれをも使用できる。ベクターの構築及び細胞を形質転換するための技術は本分野において周知であり、一般にはManiatisらの、Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory Press, NY, Vol. 1-3, 1989を参照できる。その際、目的の遺伝子の効率的な転写を達成するために、それをプロモーター-オペレーター領域と機能的に結合させる。原核細胞及び真核細胞の形質転換に使用できる種々の発現ベクターは周知であり、The Promega Biological Research Products Catalogue及びThe Stratagene Cloning Systems Catalogueが参照できる。本発明のGLP-1誘導体の生産には、広く用いられている微生物と哺乳類培養細胞を宿主とした物質生産系が利用できる。また、安価で安全な物質生産システムとして、前記のような形質転換植物を用いた物質生産システムも利用できる。

【0045】

[本発明GLP-1誘導体の利用]

本発明で生産されたGLP-1誘導体は、植物種子等の貯蔵器官の形で、或いは精製、分離して製剤の形で、或いは該成分を添加した飲食品のような形で摂取して、利用することができる。製剤の形で利用する場合はGLP-1誘導体からなる成分を、製剤的に許容される担体、希釈剤、賦形剤または吸収促進剤と組み合わせて製剤化し、医薬組成物として利用することもできる。本発明のGLP-1誘導体は、GLP-1が関与する各種疾患に有効であり、例えば、インスリン非依存性慢性糖尿病の処置、インスリン依存性慢性糖尿病の処置、肥満の処置、または、食欲抑制のために、使用することができる。

【0046】

【実施例】

以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明する。しかしながら、本発明は下

記実施例に限定されるものではない。なお、以下の実施例において、更に詳細な実験操作は、特に述べる場合を除き、分子生物学的手法についてはMolecular Cloning (Sambrook et. al., 1989) 又は製造業者の取り扱い説明書に従い行われた。

【0047】

[実施例1]

I. プラスミド pG1bGLP130Hm の作製

pTL7 (H.Ebinuma et al., Molecular Methods of Plant Analysis, 22:95, 2002) のEco RIとSse8387I制限酵素部位間に、制限酵素Eco RIとSse8387Iで切り出したイネグロブリンプロモーター、配列番号1に示す [Ser⁸、Gln²⁶、Asp³⁴] - GLP-1 (7-36 amide) をコードする遺伝子が可変領域 (109番目のアミノ酸部位) に挿入されたイネグロブリン遺伝子、及び、ノパリン合成酵素のポリアデニル化シグナルとが連結された遺伝子断片を挿入して、プラスミド pG1bGLPを得た。なお、[Ser⁸、Gln²⁶、Asp³⁴] - GLP-1 (7-36 amide) は、配列番号2に示すように、GLP-1の7~36番目のアミノ酸からなり、その8位をセリンに、26位をグルタミンに、34位をアスパラギン又はアスパラギン酸に置換した誘導体であるが、イネグロブリン遺伝子への挿入にあたって、そのN末側にリジン残基 (AAG) を付加している。

【0048】

一方、pUC18を制限酵素Kpn Iで切出して、T4ポリメラーゼによりその切断末端を平滑化した後、再結合して、プラスミド pUC18△Kpn Iを得た。pNPI130 (特開平9-154580号公報) より、酵母の部位特異的組換え系の組換え配列Rsに挟まれた領域を制限酵素Sse8387Iで切出して、プラスミド pUC18△Kpn IのSse8387I制限酵素部位に挿入することによりプラスミド pNPI130PUCを得た。

更に、プラスミド pNPI140 (特開平9-154580号公報) より、CaMV35Sプロモーター、Hm (ハイグロマイシン耐性) 遺伝子及びノパリン合成酵素のポリアデニル化シグナルが連結された遺伝子断片を、制限酵素Kpn I

で切出してプラスミド pNP I 130 PUC の Kpn I 制限酵素部位に挿入し、プラスミド pNP I 130 Hm を得た。

【0049】

目的とするプラスミドは、この pNP I 130 Hm より、酵母の部位特異的組換え系の組換え配列 R s に挟まれた領域を制限酵素 Sse8387I で切出して、プラスミド pG l b G L P の Sse8387I 制限酵素部位に挿入することにより得られ、これをプラスミド pG l b G L P 130 Hm (平成15年3月24日付で独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センターにて国際寄託済) と命名した。pG l b G L P 130 Hm の作製スキムを図1～4に、また、この pG l b G L P 130 Hm において植物染色体中に組込まれることとなる領域 (T-DNA 領域) の制限酵素地図を図4に示す。図1～4中、G l b -P はイネグロブリン遺伝子のプロモーターを、G L P は [S e r⁸, G l n²⁶, A s p³⁴] -G L P -1 (7-36 amide) をコードする遺伝子を、globulin はイネグロブリン遺伝子を、T はノバリンシンターゼ遺伝子のポリアデニル化シグナルを、l a は l a c Z' 遺伝子の断片を、35 S -P はカリフラワーモザイクウィルスの 35 S プロモーターを、i p t は i p t 遺伝子を、丸で囲った T は i p t 遺伝子自身のポリアデニル化シグナルを、R は組換え酵素遺伝子を、矩形で囲まれた三角形は組換え配列 R s とその配列方向を、Hm はハイグロマイシン耐性遺伝子を、また R B と L B は T-DNA 領域の境界配列を表している。

【0050】

II. アグロバクテリウムへの pG l b G L P 130 Hm の導入

A. ツメファシエンス EHA 105 株を、10 mL の Y E B 液体培地 (ビーフエキス 5 g/L、酵母エキス 1 g/L、ペプトン 5 g/L、シヨ糖 5 g/L、2 mM MgSO₄、22℃での pH 7.2 (以下、特に示さない場合、22℃での pH とする。)) に接種し、OD₆₃₀ が 0.4 から 0.6 の範囲に至るまで、28℃で培養した。培養液を、6900×g、4℃、10分間遠心して集菌した後、菌体を 20 mL の 10 mM HEPES (pH 8.0) に懸濁して、再度 6900×g、4℃、10分間遠心して集菌し、次いでこの菌体を 200 μl の Y E B 液体培地に懸濁して、これをプラスミド導入用菌液とした。

【0051】

0. 5 ml チューブ内で、プラスミド導入用菌液 50 μ l と 3 μ l のプラスミド pG1bGLP130Hm を混合し、これにエレクトロポレーション法（ジーンパルサーII システム [BIORAD 社]）を用いてプラスミドを導入し、次いで 200 μ l の YEB 液体培地を加えて 25℃ で 1 時間振とうして培養した。この菌体を、50 mg/L カナマイシン添加 YEB 寒天培地（寒天 1.5 w/v %、他の組成は上記に同じ。）に播種して 28℃ で 2 日間培養し菌コロニーを得た。さらに、この菌コロニーを YEB 液体培地に移植して更に培養した後、その菌からアルカリ法でプラスミドを抽出し、A. ツメファシエンス EHA105 株にプラスミド pG1bGLP130Hm が導入されていることを確認し、これらの菌をそれぞれ EHA105 (pG1bGLP130Hm) とした。

【0052】

III. 感染材料の調製

遺伝子導入の対象として、イネ品種「日本晴」を用い、その完熟種子の殺菌を、細胞工学別冊 植物細胞工学シリーズ4 モデル植物の実験プロトコル（p 93-98）の方法に従い行った。殺菌された完熟種子を、N6C12 培地（N6 無機塩類及びビタミン類、30 g/L シュークロース、2.8 g/L プロリン、0.3 g/L カザミノ酸、2 mg/L 2,4-D、4 g/L ゲルライト、pH=5.8）に置床し、サージカルテープでシールして 28℃ 明所で培養して発芽させ、アグロバクテリウム EHA105 (pG1bGLP130Hm) による感染材料とした。

【0053】

IV. EHA105 (pG1bGLP130Hm) によるイネの形質転換および形質転換イネの作製

YEB 寒天培地（ビーフエキス 5 g/L、酵母エキス 1 g/L、ペプトン 5 g/L、ショ糖 5 g/L、2 mM MgSO₄、15 g/L バクトアガー）で培養したアグロバクテリウム EHA105 (pG1bGLP130Hm) を、YEB 培地で 25℃、180 rpm で一晩培養後、3000 rpm、20 分間遠心して集菌し、アセトシリンゴン（10 mg/L）を含む N6 液体培地（N6 無機塩類

及びビタミン類 (Chu C.C., 1978, Proc.Symp.Plant Tissue Culture, Science Press Peking, pp.43-50)、30 g/L シュークロース、2 mg/L 2, 4-D、pH=5.8) に、OD₆₃₀=0.15 となるように懸濁し、感染用アグロバクテリウム懸濁液とした。

【0054】

IIIで調整した発芽種子を50 ml チューブに入れ、そこに感染用アグロバクテリウム懸濁液を注ぎ浸漬した。1.5分間の浸漬後、アグロバクテリウム懸濁液を捨て、発芽種子を滅菌したろ紙の上に置いて余分な水分を除去し、その後、共存培養培地 N6C12 培地 (N6 無機塩類及びビタミン類、30 g/L シュークロース、2.8 g/L プロリン、0.3 g/L カザミノ酸、2 mg/L 2, 4-D、4 g/L ゲルライト、pH=5.2) に置床し、サージカルテープでシールして28℃暗所で3日間培養した。その後、共存培養を行った発芽種子を、N6C12TCH25 培地 (N6 無機塩類及びビタミン類、30 g/L シュークロース、2.8 g/L プロリン、0.3 g/L カザミノ酸、2 mg/L 2, 4-D、500 mg/L カルベニシリン、25 mg/L ハイグロマイシン、4 g/L ゲルライト) で1週間培養した後、発芽した芽を胚盤組織から切り出した。

【0055】

次いで、この胚盤をN6C14TCH25 培地 (N6 無機塩類及びビタミン類、30 g/L シュークロース、2.8 g/L プロリン、0.3 g/L カザミノ酸、4 mg/L 2, 4-D、500 mg/L カルベニシリン、25 mg/L ハイグロマイシン、4 g/L ゲルライト) でさらに1週間培養し、更に、MSRC 培地 (MS 無機塩類及びビタミン類 (Murashige, T. and Skoog, F., 1962 Physiol. Plant., 15, 473)、30 g/L シュークロース、30 g/L sorbitol、2 g/L casamino acids、500 mg/L カルベニシリン、4 g/L ゲルライト) で培養したところ、EHA105 (pG1bGLP130Hm) との共存培養後、1ヶ月から2ヶ月の間に芽又は幼植物体が再分化した。再分化した芽又は幼植物体は発根培地に移植して生育させ、背丈20 cm程度の幼苗を得た。この幼苗より、DNeasy 96 Plant Kit (QIAGEN社) を用いて染

色体DNAを抽出し、PCR法にて [Ser⁸, Gln²⁶, Asp³⁴] -GLP-1 (7-36 amide) をコードする遺伝子の存在を確認した。

【0056】

このとき、PCRプライマーとしては、グロブリン遺伝子の可変領域に挿入された [Ser⁸, Gln²⁶, Asp³⁴] -GLP-1 (7-36 amide) をコードする遺伝子を検出するため、プライマー 3-1:5'-GGATCCATGGCTAGCAAGGTCGTC-3' (配列番号3) と 3-3:5'-GATCACTATCTCGTTGCATGCAACAC-3' (配列番号4) を用いた。得られたPCR反応物 (約700bp) はアガロースゲル電気泳動を用いて分析し、染色体DNA中の、[Ser⁸, Gln²⁶, Asp³⁴] -GLP-1 (7-36 amide) をコードする遺伝子の存在を確認した。

その結果、アグロバクテリウム感染処理に供したイネ種子の約3%から、上記 [Ser⁸, Gln²⁶, Asp³⁴] -GLP-1 (7-36 amide) をコードする遺伝子の導入が確認された。

こうして [Ser⁸, Gln²⁶, Asp³⁴] -GLP-1 (7-36 amide) をコードする遺伝子の導入が確認された組換えイネ幼苗を、土に馴化し、太陽光室にて栽培し、完熟種子を収穫した。

【0057】

V. タンパク解析

IV. で得た完熟種子10mgあたり、10% (v/v) グリセロール、0.25% (w/v) SDS、5% 2-メルカプトエタノールを含む、62.5mM のTris-HCl (pH6.8) 抽出バッファー250 μ lを用いて全タンパク質を抽出し、100℃にて5分処理した後に、SDS-PAGEに供した。SDS-PAGEは15% (w/v) ポリアクリルアミド (アクリルアミド:N, N'-メチレンビスアクリルアミド=30:0.8) ゲルを用いて行った。

得られたゲル画像を、解析ソフトImage Gauge (富士写真フィルム) にて解析し、[Ser⁸, Gln²⁶, Asp³⁴] -GLP-1 (7-36 amide) をコードする遺伝子がグロブリンの可変領域に挿入された融合タンパクの蓄積レベルを調査した。その結果を図5に示す。

【0058】

[比較例 1]

イネグロブリンプロモーター、配列番号 1 に示す [Ser⁸, Glⁿ²⁶, Asp³⁴] - GLP-1 (7-36 amide) をコードする遺伝子が可変領域に挿入されたグロブリン遺伝子、及び、ノパリン合成酵素のポリアデニル化シグナルが連結された遺伝子断片を含む、図 6 記載の従来型ベクター pGlbGLP-Hm を用いてイネの完熟種子に遺伝子導入を行った他は、実施例 1 と同様にして、遺伝子導入を行い、芽又は幼植物体を再分化させ、この芽又は幼植物体植物個体を再生して形質転換イネを得、完熟種子を収穫して、この完熟種子についてタンパク解析を行った。その結果を図 5 に示す。

図 5 より明らかなように、[Ser⁸, Glⁿ²⁶, Asp³⁴] - GLP-1 (7-36 amide) をコードする遺伝子がグロブリンの可変領域に挿入された融合タンパクは、実施例 1 で生産されたイネ完熟種子中に高蓄積し、比較例 1 と比較して最高で約 6 倍のレベルを示した (図 5)。

【0059】

[実施例 2]

I. GLP-1 誘導体の合成

以下に示す GLP-1 誘導体を、Model 430A ペプチド合成機 (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) による固相合成によって合成し、HPLC により精製後、マススペクトルにより合成品を確認した。純度は 95% 以上のものを使用し、インビトロおよびインビボでの試験に供した。

比較製造例 1. GLP-1 (7-36 amide)

(天然型 GLP-1)

比較製造例 2. [Ser⁸] - GLP-1 (7-36 amide)

比較製造例 3. [Gly⁸] - GLP-1 (7-36 amide)

製造例 1. [Gln²⁶, Asn³⁴] - GLP-1 (7-36 amide)

【0060】

II. GLP-1 誘導体のサイクリック AMP 産生活性

ヒト GLP-1 受容体の公表された DNA 配列 (Graziano ら、Biochem Biophys Res Com, 196:141-146, 1993) に基づき発現ベクターを構築した。チャイニー

ズハムスター卵巣CHO-K1細胞を当該ベクターで形質転換し、ヒトGLP-1受容体を発現する組換えCHO-K1細胞を得た。このヒトGLP-1受容体発現細胞を 1×10^4 cells/ml/wellで24ウエルプレートに植え込み、3日後にアッセイに使用した。

アッセイ方法は、前記細胞をGLP-1誘導体の存在下に緩衝液(PBS、5.6 mMグルコース、1 mMイソブチルメチルキサンチン、 $20 \mu\text{M}$ Ro20-1724、0.5% BSA、pH 7.4)中で37℃、30分間インキュベーションした。5 N塩酸を $10 \mu\text{l}$ 加えてインキュベーションを停止した。各種GLP-1誘導体とGLP-1受容体との反応により細胞内に形成されるサイクリックAMPを、cAMP-ScreenTM system (Applied Biosystems) による酵素免疫アッセイにより測定した。図7に各種GLP-1誘導体のサイクリックAMP産生活性を示した。

この結果、[Ser⁸]-GLP-1 (7-36 amide)、[Gly⁸]-GLP-1 (7-36 amide)、および[Gln²⁶, Asn³⁴]-GLP-1 (7-36 amide)は、天然型GLP-1と同等のサイクリックAMP産生活性を持っていた。

【0061】

[実施例3]

製造例1の[Gln²⁶, Asn³⁴]-GLP-1 (7-36 amide)について、トリプシン処理後、実施例2と同様にしてサイクリックAMP産生活性を測定することにより、トリプシン耐性を調査した。

即ち、合成で得た上記GLP-1誘導体を、50 mM炭酸水素アンモニウム pH 7.8に $500 \mu\text{g/ml}$ の濃度になるように溶解した。この溶液 $100 \mu\text{l}$ に、 $500 \mu\text{g/ml}$ トリプシン溶液(Promega社製: Cat.No. V5113)を $5 \mu\text{l}$ 加えて、37℃、1時間反応させた。反応停止は、71.5%エタノール $1200 \mu\text{l}$ (final 65%)を加えて行い、4℃で5分間の15,000 rpm遠心により上清を回収し、エバポレーションした。乾固物を蒸留水に溶解し、活性測定に用いた。

図8は、トリプシン処理前と処理後の[Gln²⁶, Asn³⁴]-GLP-1 (

7-36 amide) の活性の濃度依存性を示したものである。[Gln²⁶, Asp³⁴]-GLP-1 (7-36 amide) は、トリプシン処理前と処理後で活性に違いがなく、トリプシンに対して耐性であることがわかった。

【0062】

【実施例 4】

実施例 1 で得られたイネ完熟種子より、0.025 M 水酸化ナトリウム溶液により、[Ser⁸, Gln²⁶, Asp³⁴]-GLP-1 (7-36 amide) とグロブリンとが融合したタンパクを抽出し、これを 50 mM 炭酸水素アンモニウム pH 7.8 で 15 倍希釈後、83 µg/ml トリプシン溶液 (Promega 社製: Cat. No. V5113) を 6 µl 加えて、37℃ で反応させた。1、2、4、6、20 時間の反応液に 71.5% エタノール 1200 µl (final 65%) を加えて反応停止した。4℃ で 5 分間の 15,000 rpm 遠心により上清を回収し、エバポレーションした。乾固物を蒸留水に溶解し活性測定を行った。

図 9 は、コメに発現させ、融合タンパクとして得た [Ser⁸, Gln²⁶, Asp³⁴]-GLP-1 (7-36) のトリプシン処理時間と活性の関係をみたものである。トリプシン処理により初めてサイクリック AMP 産生活性が出現し、またトリプシン処理時間に関係なく、この活性が維持された。このことから、[Ser⁸, Gln²⁶, Asp³⁴]-GLP-1 (7-36 amide) は、トリプシン耐性であることがわかった。

【0063】

製造例 2. [Ser⁸, Gln²⁶, Asp³⁴]-GLP-1 (7-36 amide)

【0064】

【発明の効果】

本発明により、遺伝子工学を用いた、安価で安全な、かつ効率的な物質生産システムとして、組換えタンパク質が高生産された植物貯蔵器官の生産方法による物質生産システムが提供される。本発明の方法により、健康増進に役立つ成分を有意に蓄積した食品を提供することを可能とする。また、本発明の方法は、医薬品や工業原料として有用な物質を生産する高付加価値な農作物を作製する基礎技

術となりうる。

更に、本発明は、食物摂取により消化管より分泌され、膵臓に働いて糖依存的なインスリン分泌を刺激するホルモンとして知られている GLP-1 を本発明の方法により製造することを包含するものである。

【0065】

更に本発明において提供される新規 GLP-1 誘導体は、その利用に際しての摂取時に問題となるトリプシン等の消化酵素による分解に対し、該酵素に対する耐性をもち、更に、摂取、吸収後の血漿中での安定性に対して問題となるジペプチジルペプチダーゼIVによる分解に対し、該酵素に対する耐性を持つという優れた特性を有するものであり、医薬としての利用が期待できるものである。すなわち、本発明の GLP-1 誘導体は、経口摂取された場合においても、薬効発現が可能であり、例えば、本発明方法により植物の貯蔵器官に発現させ、経口的に摂取したような場合でも、分解されることなく小腸から吸収され、薬効を発現することが可能となる。したがって、本発明で提供される GLP-1 誘導体は、GLP-1 の臨床応用の可能性を格段に高めるものであり、糖尿病患者及び肥満患者の QOL の改善に役立つものと考えられる。

【0066】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> NIPPON PAPER CO., LTD.

National Institute of Agrobiological Sciences

SANWA KAGAKU KENKYUSHO CO., LTD.

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

<120> The production method of plant storage organ that recombinant protein is high-produced and novel recombinant protein

<130> 4903

<140>

<141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 90

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(90)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:recombinant protein

<400> 1

cat tct gag gga aca ttc aca tct gat gta agt tct tac ctc gag ggc 48

His Ser Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1

5

10

15

caa gca gct caa gaa ttc atc gct tgg ctc gta gat ggc cgt 90

Gln Ala Ala Gln Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Asp Gly Arg

20

25

30

<210> 2

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence:recombinant protein

<400> 2

His Ser Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1

5

10

15

Gln Ala Ala Gln Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Asp Gly Arg

20

25

30

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

ggatccatgg ctagcaaggt cgtc

24

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

gatcactatc tcgttgcacg caacac

26

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明の実施例において、pG1bGLP130Hm作製スキムのうち、pTL7からpG1bGLPの作製までを示す図である。

【図 2】

本発明の実施例において、pG1bGLP130Hm作製スキムのうち、pUC18及びpNPI130からpNPI130PUCの作製までを示す図である。

【図 3】

本発明の実施例において、pG1bGLP130Hm作製スキムのうち、pNPI140及びpNPI130PUCからpNPI130Hmの作製までを示す図である。

【図 4】

本発明の実施例において、pG1bGLP及びpNPI130HmからpG1bGLP130Hmの作製までを示すと共に、pG1bGLP130Hmの制限酵素地図を示す図である。

【図 5】

本発明の実施例において、実施例 1 及び比較例 1 で得られたイネ完熟種子における、GLP-1 誘導体融合タンパクの蓄積レベルを示す図である。

【図 6】

本発明の実施例において、従来型ベクター pG1bGLP-Hm の制限酵素地図を示す図である。

【図 7】

本発明の実施例において、実施例 2 に示した方法に従って、比較製造例 1 の GLP-1 (7-36) amide (天然型 GLP-1)、比較製造例 2 の [Ser⁸]

—GLP—1 (7-36 amide)、比較製造例 3 の [G l y⁸] —GLP—1 (7-36 amide)、および製造例 1 の [G l n²⁶, A s n³⁴] —GLP—1 (7-36 amide) のサイクリック AMP 産生活性を測定した結果を示す図である。

【図 8】

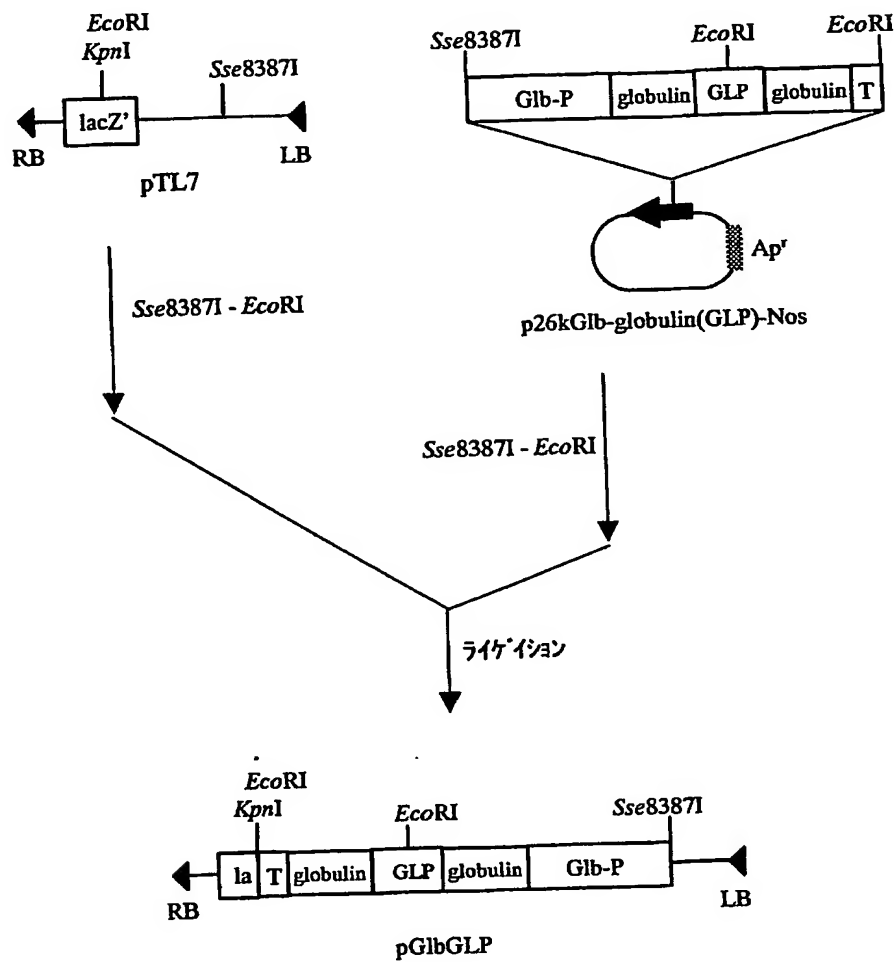
本発明の実施例において、実施例 3 に示した方法に従って、[G l n²⁶, A s n³⁴] —GLP—1 (7-36 amide) をトリプシン処理し、トリプシン処理したものと処理なしのものとで、サイクリック AMP 産生活性の濃度依存性を比較した図である。

【図 9】

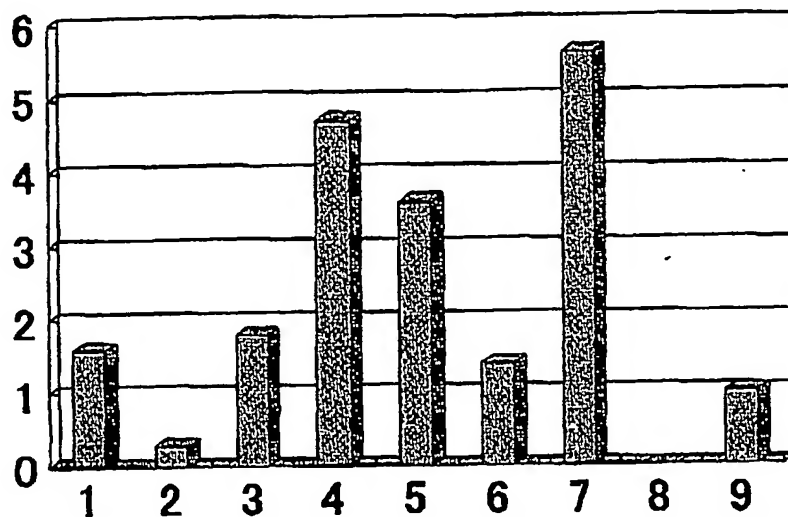
本発明の実施例において、実施例 4 で示した方法に従い、米から融合タンパクとして [S e r⁸, G l n²⁶, A s p³⁴] —GLP—1 (7-36 amide) を抽出し、この抽出画分のトリプシン処理時間とサイクリック AMP 産生活性の関係を示した図である。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 5】

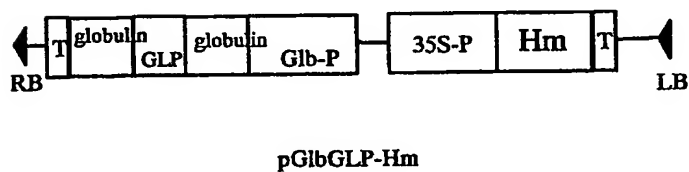


レーン1～7:実施例1により作成した系統

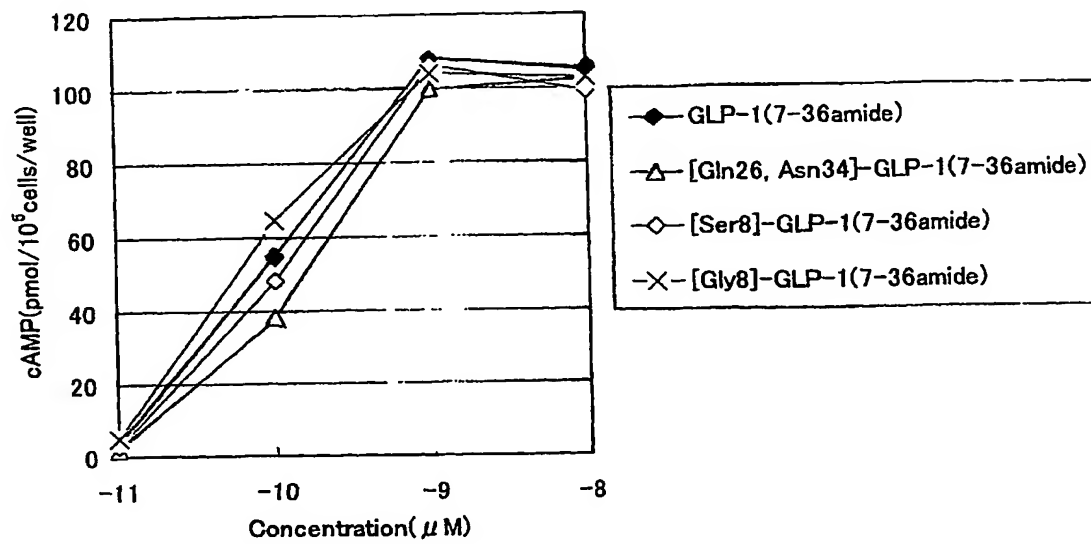
レーン8:日本晴(非組換え体)

レーン9:比較例1により作成した系統

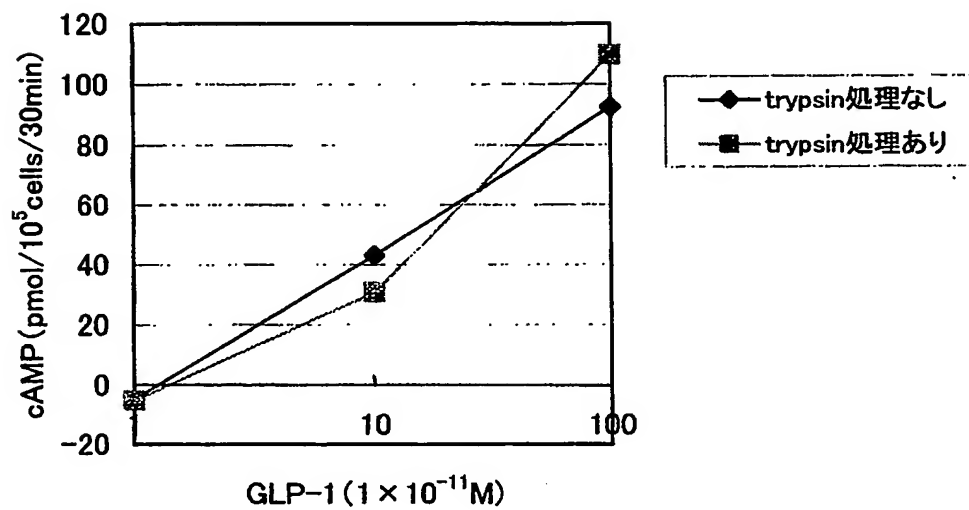
【図 6】



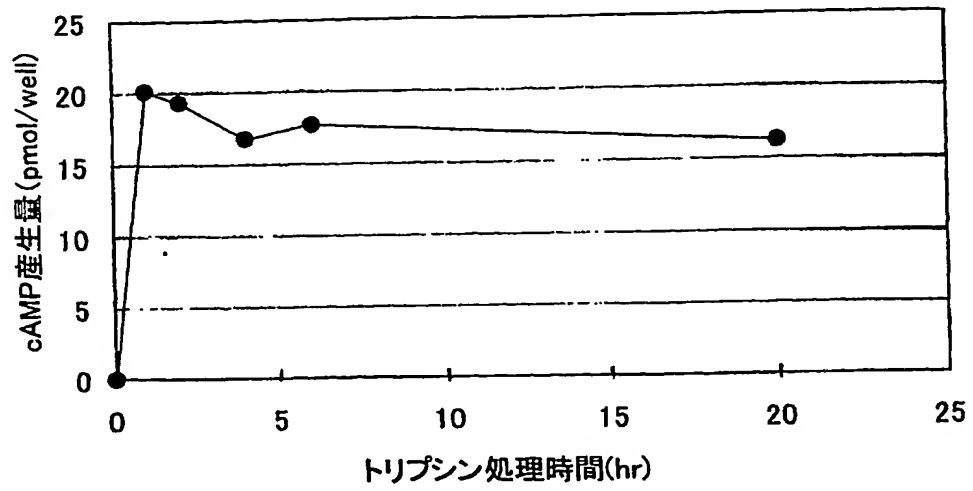
【図 7】



【図 8】



【図9】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 組換えタンパク質を植物貯蔵器官中に高生産させる方法、及び、GLP-1 誘導体を提供すること

【解決手段】 組換えタンパク質の遺伝子、サイトカイニン関連遺伝子、薬剤耐性遺伝子及び脱離能を有するDNA因子を含み、かつ、サイトカイニン関連遺伝子と薬剤耐性遺伝子は脱離能を有するDNA因子と挙動を一にする位置に存在し、植物の貯蔵器官中に発現させる組換えタンパクは脱離能を有するDNA因子とは挙動を一にしない位置に存在するベクターを用いて、形質転換することにより、組換えタンパク質が高生産された植物貯蔵器官を得る。該方法によりGLP-1を生産し、更に酵素の分解作用に対して安定化した誘導体を提供する。

認定・付加情報

特許出願の番号 特願 2003-092827
受付番号 50300521777
書類名 特許願
担当官 田丸 三喜男 9079
作成日 平成15年 6月20日

<認定情報・付加情報>

【手数料の表示】

【納付金額】 18,900円

【特許出願人】

【識別番号】 501167644
【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台2丁目1-2
【氏名又は名称】 独立行政法人農業生物資源研究所

【特許出願人】

【識別番号】 000195568
【住所又は居所】 埼玉県さいたま市日進町1丁目40番地2
【氏名又は名称】 生物系特定産業技術研究推進機構

【特許出願人】

【識別番号】 000183484
【住所又は居所】 東京都北区王子1丁目4番1号
【氏名又は名称】 日本製紙株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 000144577
【住所又は居所】 愛知県名古屋市東区東外堀町35番地
【氏名又は名称】 株式会社三和化学研究所

【代理人】

申請人
【識別番号】 100107984
【住所又は居所】 東京都港区赤坂二丁目8番5号 若林ビル3階
廣田特許事務所
【氏名又は名称】 廣田 雅紀

【選任した代理人】

【識別番号】 100102255
【住所又は居所】 東京都港区赤坂二丁目8番5号 若林ビル3階
廣田特許事務所
【氏名又は名称】 小澤 誠次

次頁無

【書類名】 手続補正書

【整理番号】 4903

【提出日】 平成15年 4月18日

【あて先】 特許庁長官殿

【事件の表示】

 【出願番号】 特願2003- 92827

【補正をする者】

 【識別番号】 501167644

 【氏名又は名称】 独立行政法人 農業生物資源研究所

【補正をする者】

 【識別番号】 000195568

 【氏名又は名称】 生物系特定産業技術研究推進機構

【補正をする者】

 【識別番号】 000183484

 【氏名又は名称】 日本製紙株式会社

 【代表者】 三好 孝彦

【補正をする者】

 【識別番号】 000144577

 【氏名又は名称】 株式会社三和化学研究所

【代理人】

 【識別番号】 100107984

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 廣田 雅紀

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許願

【補正対象項目名】 発明者

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【発明者】

【住所又は居所】 東京都北区王子 5-21-1 日本製紙株式会社技術研究所内

【氏名】 杉田 耕一

【発明者】

【住所又は居所】 東京都北区王子 5-21-1 日本製紙株式会社技術研究所内

【氏名】 遠藤 さおり

【発明者】

【住所又は居所】 東京都北区王子 5-21-1 日本製紙株式会社技術研究所内

【氏名】 海老沼 宏安

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台 2-1-2 独立行政法人農業生物資源研究所内

【氏名】 高岩 文雄

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県名古屋市東区東外堀町 35 番地 株式会社三和化学研究所内

【氏名】 城森 孝仁

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県名古屋市東区東外堀町 35 番地 株式会社三和化学研究所内

【氏名】 林 祐二

【その他】

本手続補正は、平成15年3月28日付け提出の本件出願の願書において、発明者である城森孝仁の氏名を城森幸仁と誤記したため、その誤記を訂正するためのものです。

【プルーフの要否】 要

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-092827
受付番号	50300648610
書類名	手続補正書
担当官	田丸 三喜男 9079
作成日	平成15年 4月23日

<認定情報・付加情報>

【補正をする者】

【識別番号】	501167644
【住所又は居所】	茨城県つくば市観音台2丁目1-2
【氏名又は名称】	独立行政法人農業生物資源研究所

【補正をする者】

【識別番号】	000195568
【住所又は居所】	埼玉県さいたま市日進町1丁目40番地2
【氏名又は名称】	生物系特定産業技術研究推進機構

【補正をする者】

【識別番号】	000183484
【住所又は居所】	東京都北区王子1丁目4番1号
【氏名又は名称】	日本製紙株式会社

【補正をする者】

【識別番号】	000144577
【住所又は居所】	愛知県名古屋市東区東外堀町35番地
【氏名又は名称】	株式会社三和化学研究所

【代理人】

【識別番号】	申請人
【住所又は居所】	100107984
【住所又は居所】	東京都港区赤坂二丁目8番5号 若林ビル3階
【住所又は居所】	廣田特許事務所
【氏名又は名称】	廣田 雅紀

次頁無

【書類名】 出願人名義変更届 (一般承継)
【提出日】 平成16年 2月25日
【あて先】 特許庁長官殿
【事件の表示】
 【出願番号】 特願2003- 92827
 【出願日】 平成15年 3月28日提出の特許願
【承継人】
 【識別番号】 501203344
 【氏名又は名称】 独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構
【承継人代理人】
 【識別番号】 100102978
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 清水 初志
【承継人代理人】
 【識別番号】 100108774
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 橋本 一憲
【その他】 独立行政法人農業技術研究機構法の一部を改正する法律 (平成14年12月4日法律第129号) 附則第4条第1項に基づく承継。
(なお、国が承継する資産についての政令は定めていない。)

【提出物件の目録】
 【物件名】 委任状 1

【事件の表示】
【発明の名称】 組換えタンパク質が高生産された植物貯蔵器官の生産方法及び新規組換えタンパク質

【物件名】

委任状

委 任 状

【添付書類】

7  618

平成 16 年 2 月 25 日

私は、識別番号 100102978 弁理士 清水 初志
識別番号 100108774 弁理士 橋本 一憲
を以て代理人として下記事項を委任します。

別添一覧表に記載の名義変更及び特許権移転登録申請に関する手続

住所又は居所 茨城県つくば市観音台 3-1-1

氏名又は名称 独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構

代表者 理事長 三輪 春太郎



2

出願番号	発明の名称	出願日
特願平 10-61889 号	融合細胞株とその取得方法	1998/2/27
特願 2003-353137	融合細胞株	2003/10/14
特願 2000-574251	薬物代謝機能を持つ植物及びその用途	1998/3/26
特願平 10-310927 号	高純度 β -クリプトキサンチンの製造方法	1998/10/30
特願平 10-346646 号	抗アレルギー剤	1998/11/20
特願平 10-287999 号	環境ストレス耐性植物	1998/10/9
特願 2000-620104	アブシジン酸合成を制御する新規イネ遺伝子	2001/11/20
特願 2000-620098	エチレン合成を制御する新規イネ遺伝子	2001/11/20
特願 2000-620081	雌しべの各組織に特異的な活性を有するプロモーター	2001/11/20
特願 2001-535562	植物の感光性遺伝子およびその利用	2002/4/4
特願 2001-535563	植物の感光性遺伝子 Hd1 およびその利用	2002/4/4
特願平 11-330680 号	タバート属特異的ジंकフインガー型転写因子の遺伝子を用いて花粉発性を低下させる方法	1999/11/19
特願 2002-234201	タバート属特異的ジंकフインガー型転写因子の遺伝子を用いて花粉発性を低下させる方法(分割出願)	2002/8/9
特願 2003-110911	タバート属特異的ジंकフインガー型転写因子の遺伝子を用いて花粉発性を低下させる方法(分割出願)	2003/4/15
特願平 11-330681 号	花粉特異的ジंकフインガー転写因子の遺伝子を用いて花粉発性を低下させる方法	1999/11/19
特願 2002-234207	花粉特異的ジंकフインガー転写因子の遺伝子を用いて花粉発性を低下させる方法(分割出願)	2002/8/9
特願 2003-110912	花粉特異的ジंकフインガー転写因子の遺伝子を用いて花粉発性を低下させる方法(分割出願)	2003/4/15
特願 2000-41704	活性化酵素の不活性化方法	2000/2/18
特願 2000-071533	人工シャペロン用キット	2000/3/15
特願 2000-83067	葉の形状を制御する新規イネ遺伝子	2000/3/23
特願 2000-149106	ブラシノステロイド応答に関する新規遺伝子	2000/5/19
特願 2000-195672	抗アレルギー剤	2000/6/29
特願 2000-266083	ベクターモノカリオンを用いた紫紋羽病菌に対する新規な	2000/9/1
特願 2000-251606	外来遺伝子産物を植物の種子中に高度に蓄積させる方法	2000/8/22
特願 2000-286097	耐暑性の向上した形質転換植物及びその作出方法	2000/9/20
特願 2000-316330	近赤外分光法を用いた血液分析法および血液分析装置	2000/10/17
特願 2000-316331	近赤外分光法を用いた液状試料の分析法および分析装置	2000/10/17
特願 2000-313577	マイクロスフィアの製造方法および製造装置	2000/10/13
特願 2000-311295	イネ貯蔵タンパク質の発現を制御する bzIP 型転写因子	2000/10/11

出願番号	発明の名称	出願日
特願 2000-347924	動物の受精卵の共培養担体及びこの担体を用いる動物の受精卵の培養方法	2000/11/15
特願 2000-005221	プロリン分解系の抑制により植物のストレス耐性を上昇させる方法	2000/1/5
特願 2000-356839	植物の開花を誘導する遺伝子Hid3a およびその利用	2000/11/24
特願 2000-330642	MADS ボックス遺伝子を標的とした植物の花型の改良	2000/10/30
特願 2001-16569	病原性低下因子を含む白紋羽病菌分離株W370	2001/1/25
特願 2001-50208	豚回虫感染幼虫(Ascaris suum)の14KDa 抗原、それをコードする核酸分子及びそれらの利用	2001/2/26
特願 2001-134453	新規遺伝子	2001/5/1
特願 2002-216303	舌上皮前駆細胞の単離培養方法およびその分化誘導方法	2002/7/25
特願 2001-239980	塩ストレス耐性を制御する新規イネ遺伝子	2001/8/7
特願 2003-539411	フィトクロムCの発現制御による植物の開花時期の調節	2003/9/9
特願 2001-266001	単分散複合型エマルションの製造方法	2001/9/3
特願 2001-273689	米のDNA食味判定技術及び籾/玄米半粒による良食味米選抜方法	2001/9/10
特願 2001-277332	スターチシンターゼ I 型の機能解明と新規デンプン作出法	2001/9/12
特願 2001-284927	カイコ卵へのポリヌクレオチドの効率的導入方法	2001/9/19
特願 2001-285663	休眠卵を産生するカイコ品種へのポリヌクレオチドの導入方法	2001/9/19
特願 2001-284786	抗バスマクシウイルス剤	2001/9/19
特願 2002-00796	豚回虫(Ascaris suum)感染幼虫の16KDa 抗原、それをコードする核酸分子及びそれらの利用	2002/1/7
特願 2002-28109	種子成熟後期及び発芽期特異的誘導生プロモーター	2002/2/6
特願 2002-145183	ブラシノライド応答性遺伝子およびその利用	2002/5/20
特願 2002-151627	病害抵抗性反応を制御する新規遺伝子とその利用	2002/5/24
特願 2002-153807	植物の開花時期を促進する Ehd1 遺伝子およびその利用	2002/5/28
特願 2002-215112	DNA脱塩基部位の検出方法	2002/7/24
特願 2002-243551	寄生虫の無機ピロホスファターゼ、それをコードする核酸分子及びそれらの利用	2002/8/23
特願 2002-252606	植物の開花促進遺伝子 RFT1 および植物の開花時期を予測する方法	2002/8/30
特願 2002-276051	新たな機能を持つジベレリン 2-酸化酵素遺伝子およびその利用	2002/9/20
特願 2002-276398	ブタノステロイドの生合成に関与しているシクロムP450モノオキシゲナーゼ遺伝子の改変および/または過剰発現による単子葉植物の形質の制御方法およびこの遺伝子を用いて改変された単子葉植物	2002/9/20

4

出版番号	発明の名称	出願日
特願 2002-289848	DNAの伸長固定方法	2002/10/2
特願 2002-289855	DNAを伸長、固定する方法	2002/10/2
特願 2002-301454	カイコを利用したタンパク質の製造方法	2002/10/16
特願 2002-301503	ユニ由来インスレーターを用いた遺伝子発現ベクター	2002/10/16
特願 2002-376108	DNA配列情報解析法	2002/12/26
特願 2003-053023	種子の休眠を維持する方法	2003/2/28
特願 2003-054495	マダニのヒロプラズマ原虫殺虫ペプチドタンパク質、それをコードする核酸分子及びそれらの利用	2003/2/28
特願 2003-60615	ゲノムDNAの標的メチル化領域の脱メチル化法	2003/3/6
特願 2003-067173	部位特異的組換え酵素遺伝子の一過性発現によるマーカー遺伝子の除去技術	2003/3/12
特願 2003-067262	UVDE 発現による相同組換え頻度の向上	2003/3/12
特願 2003-092455	未分化細胞を選別する方法およびその利用	2003/3/28
特願 2003-098516	舌上皮由来細胞株KT-1及びその用途	2003/4/1
特願 2003-154226	アセチルコリンエステラーゼ活性を有するタンパク質、その精製方法および遺伝子	2003/5/30
特願 2001-35632	カタリピック酸及びまたはプニシク酸の合成に関する遺伝子	2001/2/13
特願 2001-174553	プロリン蓄積能力の高いイネ科植物およびその製造方法	2001/6/8
特願 2002-30555	植物の耐干性の簡易評価法	2002/2/7
特願 2002-53281	光スキャニング装置	2002/2/28
特願 2002-53282	微小領域光処理装置	2002/2/28
特願 2002-215940	中枢神経細胞突起再生剤及びその生理作用を有する高機能性製品	2002/7/25
特願 2002-223686	化学発光および蛍光の経時変化測定装置および方法	2002/7/29
特願 2002-271730	抗アレルギー成分を含有する機能性飲食品	2002/9/18
特願 2002-274742	人工漁場	2002/9/20
特願 2002-273438	trans-11-, cis-13-共役二重結合をもつ脂肪酸の合成に関与する遺伝子およびその利用	2002/9/19
特願 2002-294471	ダイアフラムを用いフィルタ機能を有するバルブ	2002/10/8
特願 2002-297423	土壌病害防除剤および土壌病害防除法	2002/10/10
特願 2002-305907	土壌病害防除剤および土壌病害防除法	2002/10/21
特願 2002-305824	DNA の変異導入法	2002/10/21
特願 2002-305896	特性を改変した蛋白質の作出方法	2002/10/21
特願 2002-320576	耐熱性コージビオースホスホリラーゼ	2002/11/1

5

出願番号	発明の名称	出願日
特願 2002-320569	高重合度オリゴ糖生成コージビオースホスホリラーゼ	2002/11/1
特願 2002-314333	塩基配列解析方法及び装置	2002/10/29
特願 2002-332090	植物の転写因子をコードする遺伝子	2002/11/15
特願 2002-347291	α -グルコシダーゼ遺伝子を含有する組換えベクター、形質転換体およびそれを用いた膜の製造方法	2002/11/29
特願 2002-349716	細胞培養用セル	2002/12/2
特願 2003-080847	ストレス誘導性プロモーター及びその利用方法	2003/3/24
特願 2002-380936	小麦粉の製パン性の改良法と本法で得られるパン類	2002/12/27
特願 2002-380937	超強力小麦粉含有改質米粉とそれを用いた米粉食品	2002/12/27
特願 2002-380938	米粉パンの製造法と本法によって得られるパン類	2002/12/27
特願 2002-18018	低カフェインの茶葉からの抗アレルギー成分含有機能性飲食品	2003/1/27
特願 2002-18017	茶葉を原料とした抗アレルギー作用を有する機能性食品素材	2003/1/27
特願 2002-18019	抗アレルギー効果増強製造法及び本法を用いて製造された機能性飲食品	2003/1/27
特願 2003-033732	結晶1-ケストース製造に用いる β -フルクトフラノシダーゼの選抜法	2003/2/12
特願 2003-063181	スフィンゴ糖脂質の判別法	2003/3/10
特願 2003-067049	イネ由来のストレス誘導性プロモーター	2003/3/12
特願 2003-069917	重金属蓄積能が強化された植物体	2003/3/14
特願 2003-69067	時間分解蛍光偏光解消法による分析方法及び装置	2003/3/14
特願 2003-69034	細胞の処理に用いるセル	2003/3/14
特願 2003-89353	静電マイクロバルブ及びポンプ	2003/3/27
特願 2003-051882	酵素活性測定方法、その方法に用いる固相及びその製造方法、酵素阻害剤の阻害能評価方法、並びに酵素活性測定用キット	2003/2/27
特願 2003-92827	組換えタンパク質が高生産された植物貯蔵器官の生産方法及び新規組換えタンパク質	2003/3/28
特願 2003-124823	trans-11-, cis-13-共役二重結合をもつ脂肪酸の合成に関与する遺伝子およびその利用	2003/4/30
特願 2003-111246	新規 α -1,2-マンノシダーゼ遺伝子	2003/4/16
特願 2003-224853	発泡ガラス製造方法	2002/8/1
特願 2001-587156	レタスピッグベインウイルスタンパク質をコードする核酸およびその利用	2002/11/11
特願 2001-152679	植物の Ran 遺伝子変異体、および該変異体を用いた植物の開花時期の促進方法	2001/05/22

6

出願番号	発明の名称	出願日
特願 2001-358366	植物の胚特異的遺伝子および該遺伝子のプロモータ、並びにそれらの利用	2001/11/22
特願 2002-228576	キクにおける外来 DNA の発現のための EF1 α 遺伝子のプロモーターの利用	2002/08/06
特願 2002-209805	ミラフィオリレタスウイルスタンパク質をコードする核酸およびその利用	2002/07/18
特願 2002-302280	アブラナ科植物根こぶ病に対する抵抗性遺伝子検出用マイクロサテライトマーカー、およびその利用	2002/10/16
特願 2002-371170	イグサの主要栽培品種識別マーカー	2002/12/20
特願 2002-350839	変類植物の受粉性の識別方法とその利用による変類植物の改良方法	2002/12/03

7

特許名	特許番号	出願番号
昆虫由来のセルラーゼ遺伝子	特許第 3030349 号	特願平 9-206740 号
細胞壁溶解酵素遺伝子、該遺伝子を含むベクター及び形質転換体	特許第 2997800 号	特願平 9-343630 号
キシラナーゼ遺伝子、該遺伝子を含むベクター及び形質転換体	特許第 3366933 号	特願平 10-90702 号
マイクロスピアの連続製造装置	特許第 3081880 号	特願平 10-083946 号
糸状菌及び細菌に対する溶菌活性を有するイネキチナーゼ相補 DNA 及び該相補 DNA を含むプラスミドを保有する形質転換体	特許第 3376453 号	特願平 10-123905 号
オーラブテン高含有ミカン科植物の作出法	特許第 2963967 号	特願平 10-208473 号
マイクロチャネル装置及び同装置を用いたエマルションの製造方法	特許第 3012608 号	特願平 10-262849 号
クロスフロー型マイクロチャネル装置及び同装置を用いたエマルションの生成または分離方法	特許第 2981547 号	特許平 10-187345 号
植物の転写因子をコードする遺伝子	特許第 3183458 号	特願平 10-228457 号
環境ストレス耐性植物	特許第 3178672 号	特願平 10-292348 号
アミノペプチダーゼ前駆体をプロセッシングする酵素遺伝子、該遺伝子を含むベクター及び形質転換体	特許第 3030457 号	特願平 11-31118 号
単分散固体脂質マイクロスピアの製造方法	特許第 3030364 号	特願平 11-78862 号
活性化リパーゼの製造方法および活性化リパーゼを用いた油脂の改質方法	特許第 3116060 号	特願平 11-78861 号
キシロースを生成しない改変キシラナーゼ遺伝子、該遺伝子を含むベクター及び形質転換体	特許第 3030331 号	特願平 11-071715 号
病原性が低い紫紋羽病菌菌株分離株 V-70 およびそれを含む紫紋羽病防除剤	特許第 260062 号	特願平 11-260062 号
ダイズグリシニンを発現するトランスジェニック植物	特許第 3030339 号	特願平 10-223897 号
機能性エマルション	特許第 3448006 号	特願 2000-90441 号
可視および近赤外領域のスペクトル情報による哺乳動物の血漿成分の迅速測定法	特許第 3407006 号	特願 2000-364327
新規ペプチド、血圧降下剤および生理活性物質	特許第 3032822 号	特願平 10-323678 号
植物の細胞増殖因子前駆体ポリペプチド、増殖因子前駆体ポリペプチドをコードする遺伝子、植物の増殖促進方法	特許第 3038381 号	特願平 11-078612 号
タバコ由来の誘導性プロモーター領域	特許第 3236880 号	特願平 11-251615 号
乳成分連続測定装置	特許第 3268449 号	特願平 11-272825 号
マツタケ菌根の迅速人工合成法	特許第 3263730 号	特願平 11-357439 号

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-092827
受付番号	20400390618
書類名	出願人名義変更届 (一般承継)
担当官	関 浩次 7475
作成日	平成16年 4月23日

<認定情報・付加情報>

【承継人】

【識別番号】 501203344

【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台3-1-1

【氏名又は名称】 独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構

【承継人代理人】 申請人

【識別番号】 100102978

【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6
階 清水国際特許事務所

【氏名又は名称】 清水 初志

【承継人代理人】 申請人

【識別番号】 100108774

【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6
階 清水国際特許事務所

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【提出された物件の記事】

【提出物件名】 委任状 (代理権を証明する書面) 1

特願 2003-092827

出願人履歴情報

識別番号

[501167644]

1. 変更年月日

2001年 4月24日

[変更理由]

新規登録

住 所

茨城県つくば市観音台2丁目1-2

氏 名

独立行政法人農業生物資源研究所

特願 2003-092827

出願人履歴情報

識別番号

[000195568]

1. 変更年月日

2001年 5月15日

[変更理由]

住所変更

住 所

埼玉県さいたま市日進町1丁目40番地2

氏 名

生物系特定産業技術研究推進機構

2. 変更年月日

2003年 4月22日

[変更理由]

住所変更

住 所

埼玉県さいたま市北区日進町1丁目40番地2

氏 名

生物系特定産業技術研究推進機構

特願 2003-092827

出願人履歴情報

識別番号

[000183484]

1. 変更年月日

1993年 4月 7日

[変更理由]

名称変更

住 所

東京都北区王子1丁目4番1号

氏 名

日本製紙株式会社

特願 2003-092827

出願人履歴情報

識別番号

[000144577]

1. 変更年月日

1990年 8月10日

[変更理由]

新規登録

住 所

愛知県名古屋市東区東外堀町35番地

氏 名

株式会社三和化学研究所

特願 2003-092827

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[501203344]

1. 変更年月日

2001年 5月22日

[変更理由]

新規登録

住 所

茨城県つくば市観音台3-1-1

氏 名

独立行政法人 農業技術研究機構

2. 変更年月日

2003年10月 1日

[変更理由]

名称変更

住 所

茨城県つくば市観音台3-1-1

氏 名

独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構